



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ
ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΙΔΡΥΜΑ ΙΑΤΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΡΕΥΝΩΝ
ΑΚΑΔΗΜΙΑΣ ΑΘΗΝΩΝ



ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΝΑΝΟΔΙΑΤΑΞΕΙΣ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΤΡΙΓΑΖΗ ΜΑΡΙΑΝΝΑ

**«ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΒΙΟΜΟΡΙΩΝ ΓΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΕΠΙΜΟΛΥΝΤΩΝ
ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΟΥ
ΑΙΣΘΗΤΗΡΑ»**

Ερευνητικός Επιβλέπων:
Τσέκενης Γεώργιος, ΠΒΕΑΑ

Ακαδημαϊκή Επιβλέπουσα:
Ζεργιώτη Ιωάννα, ΕΜΠ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΖΕΡΓΙΩΤΗ ΙΩΑΝΝΑ, ΣΕΜΦΕ, ΕΜΠ

ΤΣΟΥΚΑΛΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ, ΣΕΜΦΕ, ΕΜΠ

ΤΟΠΟΓΛΙΔΗΣ ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ, ΕΠ.ΥΛ., ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΑΣ

ΑΘΗΝΑ, ΟΚΤΩΒΡΗΣ 2019

Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ). Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον μεταδιδακτορικό ερευνητή κ. Γιώργο Τσέκενη, για την καθοδήγηση και τη σημαντική συμβολή του στη διεξαγωγή των πειραμάτων, όλο αυτό το διάστημα. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά τον επιστημονικό υπεύθυνο του εργαστηρίου κ. Απόστολο Κλινάκη και την καθηγήτρια μου κ. Ιωάννα Ζεργιώτη.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου για την αμέριστη υποστήριξή τους όλα αυτά τα χρόνια, όπως και τους φίλους μου για την ενθάρρυνσή τους.

.....

Τριγάζη Μαριάννα

© (2019) Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο. All rights Reserved. Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας εργασίας, εξ ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για σκοπό μη κερδοσκοπικό, εκπαιδευτικής ή ερευνητικής φύσης, υπό την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης και να διατηρείται το παρόν μήνυμα. Ερωτήματα που αφορούν τη χρήση της εργασίας για κερδοσκοπικό σκοπό πρέπει να απευθύνονται προς το συγγραφέα. Οι απόψεις και τα συμπεράσματα που περιέχονται σ' αυτό το έγγραφο εκφράζουν το συγγραφέα και δεν πρέπει να ερμηνευτεί ότι αντιπροσωπεύουν τις επίσημες θέσεις του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στόχο της παρούσης μεταπτυχιακής εργασίας αποτέλεσε η διερεύνηση διαφορετικών πρωτοκόλλων κατασκευής βιοαισθητήρων για την ηλεκτροχημική ανίχνευση δύο κατηγοριών επιμολυντών που απαντώνται συχνά στα τρόφιμα, των φυτοφαρμάκων και των πλαστικοποιητών.

Για την κατασκευή του αισθητήρα για την ανίχνευση φυτοφαρμάκων, επιλέχθηκε το ένζυμο της Ακετυλο-χολινεστεράσης (AChE), η οποία καταλύει την αντίδραση της υδρόλυσης του υποστρώματος ακετυλοθειοχολίνης προς θειοχολίνη και οξικό οξύ. Η θειοχολίνη που παράγεται μπορεί να ανιχνευθεί μέσω της οξείδωσής της στην επιφάνεια ηλεκτροδίων. Τα φυτοφάρμακα ανιχνεύονται μέσω της αναστολής της δράσης του ενζύμου που προκαλούν, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή λιγότερης θειοχολίνης και κατά συνέπεια την μέτρηση μικρότερου ρεύματος. Για την κατασκευή του αισθητήρα δοκιμάσθηκαν τόσο μια σειρά εμπορικά διαθέσιμων ηλεκτροδίων (άνθρακα, χρυσού, άνθρακα τροποποιημένου με Prussian Blue ή με Co-Phthalocyanine) όσο και διαφορετικές τροποποιήσεις της επιφάνειας αυτών (με νανοσωματίδια μαγνητίτη, Prussian Blue, Carbon Black) με απώτερο στόχο την αύξηση της ευαισθησίας του αισθητήρα, καθώς και την επαναληψιμότητα των μετρήσεων. Από αυτές, η τροποποίηση με Carbon Black αύξησε αρκετά την αγωγιμότητα της επιφάνειας, ενώ ταυτόχρονα μείωσε το δυναμικό που απαιτείται να εφαρμοσθεί ώστε να οξειδωθεί η παραγόμενη θειοχολίνη και για αυτό το λόγο επιλέχθηκε για την κατασκευή του αισθητήρα. Κατόπιν βελτιστοποίησης μια σειράς παραμέτρων που αφορούν στην τροποποίηση των επιφανειών ηλεκτροδίων άνθρακα με Carbon Black ανιχνεύθηκαν 3 διαφορετικά φυτοφαρμάκα (carbofuran, chlorpyrifos και phosmet), τα οποία ανήκουν σε δύο σύνηθεις οικογένειες φυτοφαρμάκων τα οργανοφωσφορικά και τα καρβαμικά.

Όσον αφορά την κατασκευή του αισθητήρα για την ανίχνευση πλαστικοποιητών, χρησιμοποιήθηκαν απταμερή, νουκλειικά οξέα τα οποία έχουν την δυνατότητα μέσω της τριασδιάστατης δομής που λαμβάνουν να αναγνωρίζουν και να προσδένονται με επιλεκτικότητα σε έναν αναλύτη. Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε η επίδραση του τρόπου ακινητοποίησής τους στην επιφάνεια ηλεκτροδίων χρυσού στην ικανότητά τους να αναγνωρίζουν τον δακτύλιο φθαλικού εστέρα ο οποίος είναι κοινός σε όλους τους

πλαστικοποιητές. Λόγω του γεγονότος ότι η αναγνώριση αυτή δεν είναι ηλεκτροχημικά ενεργή πραγματοποιήθηκε μια προκαταρκτική μελέτη για την βελτιστοποίηση των συνθηκών εναπόθεσης των απταμερών με την χρήση της τεχνικής της εμπέδησης για την ανίχνευση των δύο συνηθέστερων ενώσεων της οικογένειας των πλαστικοποιητών του DEHP και του DINP.

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας μπορούν να αποτελέσουν την βάση για την περαιτέρω βελτιστοποίηση και των δύο αισθητήρων. Για την μεν ανίχνευση των φυτοφαρμάκων η γνώση που αποκτήθηκε μπορεί να χρησιμοποιηθεί μελλοντικά για την ακόμη πιο αποδοτική τροποποίηση των επιφανειών ηλεκτροδίων έτσι ώστε να καταστεί δυνατή η ανίχνευση μια μεγαλύτερης γκάμας φυτοφαρμάκων με μικρότερα όρια ανίχνευσης. Όσον αφορά τους πλαστικοποιητές, η κατανόηση της συμπεριφοράς των απταμερών και η βελτιστοποίηση του τρόπου εναπόθεσής τους σε ηλεκτρόδια θα αποτελέσει την αφετηρία για την κατασκευή ηλεκτροχημικών αισθητήρων με μεγάλη ευαισθησία και επιλεκτικότητα.

ABSTRACT

The aim of this thesis was to investigate different protocols for the fabrication of biosensors for the electrochemical detection of two classes of contaminants commonly found in food, pesticides and plasticizers.

For the construction of the sensor for pesticide detection, the acetylcholinesterase (AChE) enzyme was selected, which catalyzes the hydrolysis reaction of acetylthiocholine to thiocholine and acetic acid. The thiocholine produced can be detected by means of its oxidation at the electrode surface. Pesticides are detected through the enzyme inhibition, which results in less thiocholine production and consequently less current being measured. Towards this goal, a number of commercially available electrodes (carbon, gold, carbon modified with Prussian Blue or Co-Phthalocyanine) as well as various surface modifications (with magnetite nanoparticles, Prussian Blue, Carbon Black) were tested with the ultimate goal being to increase the sensitivity of the sensor as well as the repeatability of the measurements. The modification of carbon electrodes with Carbon Black was found to greatly increase the conductivity of the surface, while at the same time reducing the potential required to oxidize the produced thiocholine and was therefore selected for the fabrication of the sensor. Following optimization of a number of parameters related to the modification of the carbon electrode surfaces with Carbon Black, 3 different pesticides (carbofuran, chlorpyrifos and phosmet) were detected, that belong to two common families of pesticides, the organophosphates and the carbamates

For the construction of the sensor for the detection of plasticizers, aptamers nucleic acids were used that are nucleic acids capable of recognizing and binding to an analyte through the three-dimensional structure that they acquire. The present study investigated the effect their immobilization onto the surface of gold electrodes has on their ability to recognize the phthalate ring that is common to all plasticizers. Due to the fact that this recognition is not electrochemically active, a preliminary study was carried out to optimize the deposition conditions of the aptamers by employing the impedance technique to detect the two most commonly encountered molecules in the plasticizers family, DEHP and DINP.

The results of the present work can form the basis for further optimization of both sensors. For the detection of pesticides, the gained knowledge can be used in the future to further modify the electrode surfaces so as to allow the detection of a wider range of pesticides with lower detection limits. As far as plasticizers are concerned, understanding the behavior of aptamers and optimizing the way they are deposited on electrodes will be the starting point for the fabrication of highly sensitive and selective electrochemical sensors.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	3
ABSTRACT	5
ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ.....	11
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΔΗ ΕΠΙΜΟΛΥΝΤΩΝ.....	11
1.1 Φυτοφάρμακα	11
1.2 Πλαστικοποιητές	14
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ.....	16
2.1 Δομή και λειτουργία βιοαισθητήρων.....	16
2.1.1 Εισαγωγή	16
2.1.2 Ιστορική εξέλιξη των βιοαισθητήρων.....	18
2.1.3 Σχεδιασμός ενός βιοαισθητήρα	21
2.1.4 Εφαρμογές βιοαισθητήρων.....	27
2.2 Ανίχνευση επιμολυντών στα τρόφιμα με τη χρήση βιοαισθητήρων.....	29
2.2.1 Βιοαισθητήρες για την ανίχνευση παρασιτοκτόνων	29
2.2.2 Άλλες τεχνικές ανίχνευσης	37
2.3 Βιομόρια που χρησιμοποιούνται σε βιοαισθητήρες για ανίχνευση φθαλικών ενώσεων .	41
2.3.1 Απταμερή.....	41
2.3.2 Μοριακά αποτυπωμένα πολυμερή (MIPs)	42
2.4 Επιλογή κατάλληλου συστήματος ανίχνευσης φυτοφαρμάκων	44
2.4.1 Ακετυλοχολινεστεράση (AChE)	45
2.4.2 Βουτυρυλοχολινεστεράση (BuChE).....	49
2.4.3 Αλκαλική φωσφατάση (ALP)	50
2.4.4 Οξική φωσφατάση (AP)	50
2.4.5 Τυροσινάση	51
2.4.6 Οργανοφωσφορική υδρολάση (OPH)	52
2.4.7 Αφυδρογονάση αλδεϋδης (ADH)	53
2.5 Ενζυμικοί βιοαισθητήρες.....	53
2.5.1 Τρόποι ακινητοποίησης ενζύμων σε ένα βιοαισθητήρα	54
2.5.2 Έλεγχος δραστηριότητας Ακετυλοχολινεστεράσης (AChE) με χρωματομετρία.....	57
2.5.3 Βιοαισθητήρες με βάση την Ακετυλοχολινεστεράση (AChE).....	59

2.5.4 Χρήση περισσότερων του ενός ενζύμων.....	66
2.5.5 Τροποποίηση ηλεκτροδίων για τη βελτίωση της ευαισθησίας του αισθητήρα.....	67
2.6 Σύστημα ανίχνευσης φθαλικών εστέρων.....	75
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΕΙΑ	78
3.1 Βασικές έννοιες στην Ηλεκτροχημεία	78
3.1.1 Το ηλεκτρολυτικό διάλυμα σε επαφή με το ηλεκτρόδιο	78
3.1.2 Ηλεκτροδιακές Διεργασίες	80
3.2 Κυκλική Βολταμετρία (CV).....	82
3.3 Ηλεκτροχημική Φασματοσκοπία Εμπέδησης (EIS)	84
3.4 Διαφορική Παλμική Βολταμετρία (DPV)	89
3.5 Αμπερομετρία.....	90
ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ.....	93
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	93
4.1 Σκοπός της εργασίας	93
4.2 Συσκευές και υλικά.....	93
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	96
5.1 Χρωματομετρία	96
5.2 Εισαγωγή στα ηλεκτρόδια χρυσού και άνθρακα	101
5.2.1 Καθαρισμός ηλεκτροδίων	101
.....	117
5.2.2 Αρχικές ηλεκτροχημικές μετρήσεις.....	117
5.3 Τροποποίηση επιφάνειας ηλεκτροδίων χρυσού	122
5.3.1 Τροποποίηση επιφάνειας ηλεκτροδίων χρυσού με SAMs.....	122
5.3.2 Τροποποίηση επιφάνειας ηλεκτροδίων χρυσού με Διαζωνικά Άλατα.....	125
5.3.3 Τροποποίηση επιφάνειας ηλεκτροδίων χρυσού με νανοσωματίδια μαγνητήτη Fe_3O_4	127
5.4 Τροποποίηση επιφάνειας ηλεκτροδίων άνθρακα	128
5.4.1 Τροποποίηση με νανοσωματίδια μαγνητήτη Fe_3O_4	129
5.4.2 Τροποποίηση με Prussian Blue.....	131
5.4.3 Τροποποίηση με Cobalt Phthalocyanine	135
5.4.4 Τροποποίηση με Carbon Black	137

5.5 Σύγκριση των τροποποιημένων επιφανειών άνθρακα	141
5.5.1 Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων τροποποίησης.....	141
5.5.2 Εναπόθεση ενζύμου στις τροποποιημένες επιφάνειες	143
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΧΗΜΙΚΗΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗΣ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΩΝ ΑΝΘΡΑΚΑ ΜΕ CARBON BLACK.....	150
6.1 Ποσότητα Carbon Black στο ηλεκτρόδιο.....	150
6.2 Σταθερότητα τελικού στρώματος Carbon Black και φύλαξη των τροποποιημένων ηλεκτροδίων	156
6.2.1 Χρήση της αμπερομετρίας ως τεχνική χαρακτηρισμού	157
6.2.2 Μελέτη σταθερότητας και συνθήκες φύλαξης των τροποποιημένων ηλεκτροδίων	161
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΕΝΑΠΟΘΕΣΗΣ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ	171
7.1 Ακίνητοποίηση της AChE σε τροποποιημένα ηλεκτρόδια άνθρακα με Carbon Black σε χιτοζάνη	171
7.2 Επιλογή κατάλληλου υποστρώματος.....	174
7.3 Εύρεση ιδανικής αναλογίας ενζύμου- υποστρώματος.....	178
7.4 Αίχνευση φυτοφαρμάκων	179
7.4.1 Επίδραση του ACN στο ένζυμο και στο στρώμα CB/CS	179
7.4.2 Ανίχνευση Carbofuran	181
7.4.3 Ανίχνευση Chlorpyrifos και Phosmet	184
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΧΗΜΙΚΗΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗΣ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΩΝ ΧΡΥΣΟΥ ΜΕ ΑΠΤΑΜΕΡΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΦΘΑΛΙΚΩΝ ΕΣΤΕΡΩΝ.....	187
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	200
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10: ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ	204
10.1 Τεχνικές βελτίωσης της ευαισθησίας του ενζυμικού βιοαισθητήρα.....	204
10.1.1 Τροποποίηση ηλεκτροδίων με τη χρήση νανοϋλικών ή συνδυασμό αυτών	204
.....	207
10.1.2 Χρήση γενετικά τροποποιημένης AChE.....	208
10.2 Τεχνικές βελτίωσης του αισθητήρα που βασίζεται σε απταμερή	210
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	211

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	219
ΠΙΝΑΚΑΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	219
ΠΙΝΑΚΑΣ ΕΞΙΣΩΣΕΩΝ	222
ΠΙΝΑΚΑΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ	222

ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΔΗ ΕΠΙΜΟΛΥΝΤΩΝ

1.1 Φυτοφάρμακα

Ως επακόλουθο της αύξησης του παγκόσμιου πληθυσμού, η εντατικοποίηση της σύγχρονης γεωργίας συνοδεύτηκε από δραματική αύξηση της χρήσης φυτοφαρμάκων. Τα φυτοφάρμακα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην υψηλή παραγωγικότητα που επιτυγχάνεται στη γεωργία μέσω του ελέγχου των παρασίτων. Ωστόσο, τα φυτοφάρμακα είναι τοξικά, συχνά και προς τους μη στοχευόμενους οργανισμούς και η εσκεμμένη απελευθέρωσή τους στο περιβάλλον έχει σοβαρές περιβαλλοντικές συνέπειες. Είναι χημικές ουσίες με ημίσεια ζωή δεκαετιών και μεταφέρονται σε μεγάλες αποστάσεις με την παγκόσμια κυκλοφορία και μέσω της απορροής, βρίσκουν το δρόμο τους σε υδρόβια συστήματα. Έτσι, η ρύπανση του περιβάλλοντος, και ιδιαίτερα του νερού, με φυτοφάρμακα έχει γίνει ένα παγκόσμιο πρόβλημα.

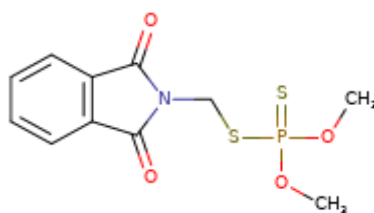
Τρεις είναι οι βασικότερες κατηγορίες φυτοφαρμάκων που απαιτείται να ανιχνεύονται στο περιβάλλον και στα τρόφιμα. Ονομαστικά είναι τα οργανοχλωρίδια, τα οργανοφωσφορικά και τα καρβαμικά παρασιτοκτόνα. Τα οργανοχλωρίδια περιλαμβάνουν μια ποικιλία χημικών ουσιών όπως τα πολυχλωριωμένα διφαινύλια (PCBs), τα πολυχλωριωμένα διβενζοφουράνια (PCDFs) και μια σειρά παρασιτοκτόνων, εκ των οποίων το DDT είναι το πιο γνωστό παράδειγμα. Αυτές οι χημικές ουσίες παραμένουν για μεγάλο χρονικό διάστημα στο περιβάλλον, για παράδειγμα το DDT έχει χρόνο ημιζωής 3-20 χρόνια. Μπορούν επίσης να βιο-συσσωρεύονται στην τροφική αλυσίδα και ειδικότερα σε λιπώδεις ιστούς.

Οι οργανοφωσφορικές ενώσεις χρησιμοποιούνται ευρέως ως εντομοκτόνα για την προστασία των καλλιεργειών και ως παράγοντες χημικού πολέμου. Αντιπροσωπεύουν περισσότερο από το 38% των συνολικών φυτοφαρμάκων που χρησιμοποιούνται παγκοσμίως. Στα οργανοφωσφορικά παρασιτοκτόνα (OPs) συμπεριλαμβάνονται το parathion, malathion, methyl parathion, chlorpyrifos, diazinon, dichlorvos, phosmet,

tetrachlorvinphos, triazophos, oxydemeton και azinphos methyl μεταξύ άλλων. Τα οργανοφωσφορικά παρασιτοκτόνα είναι τοξικά λόγω της ικανότητάς τους να ενεργούν στο νευρικό σύστημα των οργανισμών αναστέλλοντας το ένζυμο της ακετυλοχολινεστεράσης (AChE) προκαλώντας νευροτοξικότητα. Η παρουσία αυτού του ενζύμου σε έντομα, πουλιά, ψάρια και όλα τα θηλαστικά προσδίδει σε αυτή την τάξη παρασιτοκτόνων τεράστια τοξικότητα προς μη επιθυμητούς στόχους. Τα υπολείμματα OPs στο περιβάλλον μπορούν να προκαλέσουν μακροπρόθεσμη βλάβη και στην ανθρώπινη υγεία ακόμη και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Ανήκουν στην κατηγορία τοξικότητας I (εξαιρετικά τοξικά) ή στην κατηγορία τοξικότητας II (μέτρια τοξικά), σύμφωνα με την ταξινόμηση EPA. (1)

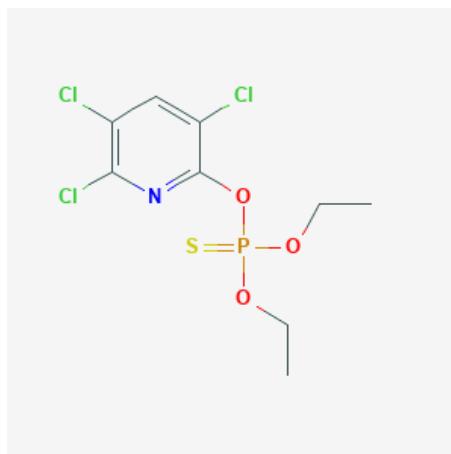
Τέλος, τα καρβαμικά παρασιτοκτόνα (carbamates) είναι επίσης αναστολείς της χολινεστεράσης με παρόμοιο μηχανισμό δράσης με τα οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα με την διαφορά ότι το υδροξύλιο του αμινοξέος της σερίνης εντός της δραστικής θέσης του ενζύμου είναι καρβαμυλιωμένο αντί φωσφορυλιωμένο. Εκτός από τις τοξικές επιδράσεις πολλών από αυτά τα φυτοφάρμακα, μακροπρόθεσμα έχουν τη δυνατότητα να διαταράξουν τα ενδοκρινικά συστήματα σε θηλαστικά, πτηνά και ψάρια. Η ικανότητα των φυτοφαρμάκων να αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς οιστρογόνων και ανδρογόνων, τους υποδοχείς θυρεοειδούς και άλλους τύπους ενδοκρινικών διαταραχών, έχει ερευνηθεί σε περιορισμένο βαθμό.

Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκαν οι οργανοφωσφορικές ενώσεις phosmet και chlorpyrifos και το καρβαμικό παρασιτοκτόνο carbofuran. Το phosmet είναι ένα πολύ αποτελεσματικό εντομοκτόνο το οποίο χρησιμοποιείται συνήθως σε όλο τον κόσμο για τον έλεγχο ορισμένων εντόμων σε καλλιέργειες και κηπευτικά. Ένα από αυτά τα έντομα είναι η μύγα καρπών ελιάς, η οποία επιτίθεται στα ελαιόδεντρα και προκαλεί σημαντικές ποσοτικές και ποιοτικές απώλειες στην παραγωγή ελαιολάδου. (2)



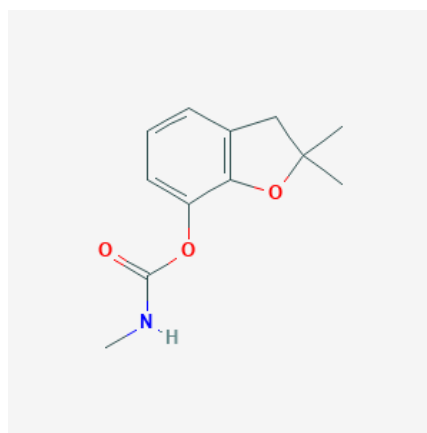
Εικόνα 1: Χημικός τύπος του Phosmet

Το chlorpyrifos είναι ένα οργανοφωσφορικό παρασιτοκτόνο που χρησιμοποιείται σε καλλιέργειες, ζώα και κτίρια για να σκοτώσει πολλά παράσιτα, συμπεριλαμβανομένων εντόμων και σκωλήκων. Θεωρείται από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO) ως μέτρια επικίνδυνη για τον άνθρωπο ουσία λόγω της οξείας τοξικότητάς του. Η έκθεση που υπερβαίνει τα συνιστώμενα επίπεδα έχει συνδεθεί με νευρολογικές επιδράσεις, μόνιμες αναπτυξιακές και αυτοάνοσες διαταραχές. (3)



Εικόνα 2: Χημικός τύπος του Chlorpyrifos

Ένα από τα ευρέως χρησιμοποιούμενα και πλέον τοξικά καρβαμικά παρασιτοκτόνα είναι το Carbofuran. Χρησιμοποιείται για τον έλεγχο των εντόμων σε μια μεγάλη ποικιλία καλλιεργειών, συμπεριλαμβανομένων της πατάτας, του καλαμποκιού και της σόγιας. Το εντομοκτόνο αυτό απορροφάται από τις ρίζες των φυτών και διανέμεται σε όλα τα οργανίδια τους. Κατατάσσεται στις εξαιρετικά επικίνδυνες ουσίες λόγω της μεγάλης τοξικότητάς του. (4)



Εικόνα 3: Χημικός τύπος του Carbofuran

Όλες αυτές οι χημικές ενώσεις, οργανοφωσφορικές και καρβαμιδικές, είναι υδρόφοβες και άρα διαλυτές σε πολικούς οργανικούς διαλύτες όπως DMF, DMSO, ακετονιτρίλιο (ACN), ακετόνη κλπ.

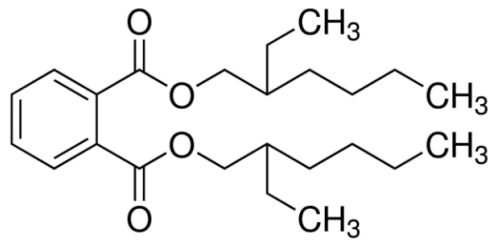
1.2 Πλαστικοποιητές

Επιπλέον, στη γεωργία και γενικότερα στο περιβάλλον χρησιμοποιούνται οι πλαστικοποιητές, ενώσεις γνωστές και ως φθαλικοί εστέρες (phthalates – PEs). Αυτές οι βιομηχανικές χημικές ουσίες έχουν πληθώρα εμπορικών χρήσεων, ως δομικά υλικά, λιπαντικά, πρόσθετα, διαλύτες, μαλακτικά για πλαστικά, συμπεριλαμβανομένων των συσκευασιών τροφίμων και ποτών, καλλυντικά, εντομοκτόνα, χρώματα, ιατρικές και φαρμακευτικές εφαρμογές. Στα πλαστικά προϊόντα προσδίδουν ευελιξία και χρησιμοποιούνται από το 1920.

Δεδομένου ότι οι φθαλικοί εστέρες δεν συνδέονται ομοιοπολικώς με το πλέγμα του πολυβινυλοχλωριδίου (πλαστικό PVC), μεταναστεύουν και εξατμίζονται απευθείας στα τρόφιμα και στην ατμόσφαιρα που είναι καθημερινά εκτεθειμένοι οι άνθρωποι και άλλα έμβια όντα και μπορούν να προσβληθούν μέσω της λήψης τροφής και νερού, της εισπνοής και της επαφής με το δέρμα.

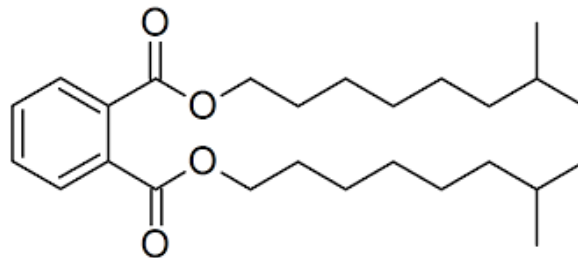
Οι φθαλικές ενώσεις έχουν δηλωθεί ως πανταχού παρόντες περιβαλλοντικοί ρύποι που προσβάλλουν το ενδοκρινικό σύστημα διαφόρων οργανισμών λόγω των καρκινογόνων και τερατογόνων επιπτώσεών τους καθώς έχουν παρατηρηθεί στα πλαίσια ερευνών στην αναπαραγωγή και την ανάπτυξη τρωκτικών.

Η Υπηρεσία Προστασίας Περιβάλλοντος (EPA) έχει καθορίσει τη μέγιστη αποδεκτή συγκέντρωση (MAC) στο νερό στα 8 µg/L για το DEHP (2-ethylhexyl phthalate), η οποία συγκαταλέγεται στα χαμηλότερα όρια συγκέντρωσης των ρύπων συμπεριλαμβανομένων των ιόντων βαρέων μετάλλων, των εντομοκτόνων και των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων. Το DEHP είναι από τους πιο ευρέως χρησιμοποιούμενους φθαλικούς εστέρες (ένα τέταρτο της συνολικής παραγωγής των πλαστικοποιητών). Λόγω των κατάλληλων ιδιοτήτων του και του χαμηλού κόστους, το DEHP χρησιμοποιείται ευρέως ως πλαστικοποιητής στην κατασκευή ειδών από PVC. Τα πλαστικά μπορούν να περιέχουν 1-40% του DEHP. (5)(6)



Εικόνα 4: Χημικός τύπος του DEHP

Μερικές ακόμη φθαλικές ενώσεις που χρησιμοποιούνται είναι το DINP (Diisononyl phthalate), DBP (Dibutyl phthalate), BBP (Benzyl butyl phthalate), DEP (Diethyl phthalate) κ.α.. Το DINP είναι ένα μείγμα χημικών ενώσεων που αποτελούμενων από διάφορους ισο-εννεύλεστερες φθαλικού οξέος και χρησιμοποιείται συνήθως σε μεγάλη ποικιλία πλαστικών ειδών.



Εικόνα 5: Χημικός τύπος του DINP

Παραδοσιακά, μέθοδοι όπως η χρωματογραφία (gas chromatography και high performance liquid chromatography), η φασματομετρία μάζας (mass spectrometry), η εκχύλιση σε στερεή φάση και η εκχύλιση σε υγρή φάση χρησιμοποιούνται για την ανάλυση της παρουσίας τοξικών ενώσεων σε περιβαλλοντικά δείγματα. Μια τέτοια ανάλυση, μπορεί να εντοπίσει τα φυτοφάρμακα και τις συγκεντρώσεις τους. Αυτές οι μέθοδοι είναι ακριβείς, ευαίσθητες και ικανές για ταυτόχρονη ανίχνευση πολλαπλών ομοειδών χημικών ενώσεων. (7)

Ωστόσο, αυτές οι μέθοδοι παρουσιάζουν ορισμένους περιορισμούς όπως η περιπλοκότητα, το υψηλό κόστος, ο μεγάλος χρόνος ανίχνευσης, η αυξημένη παραγωγή εργαστηριακών αποβλήτων ενώ απαιτείται εξειδικευμένο προσωπικό. Επομένως, υπάρχει πρωταρχική απαίτηση για ένα χαμηλού κόστους σύστημα, το οποίο θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την άμεση διαλογή σε πραγματικό χρόνο τροφίμων και ποτών για την ανίχνευση της παρουσίας φθαλικών ενώσεων. (8)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ

2.1 Δομή και λειτουργία βιοαισθητήρων

2.1.1 Εισαγωγή

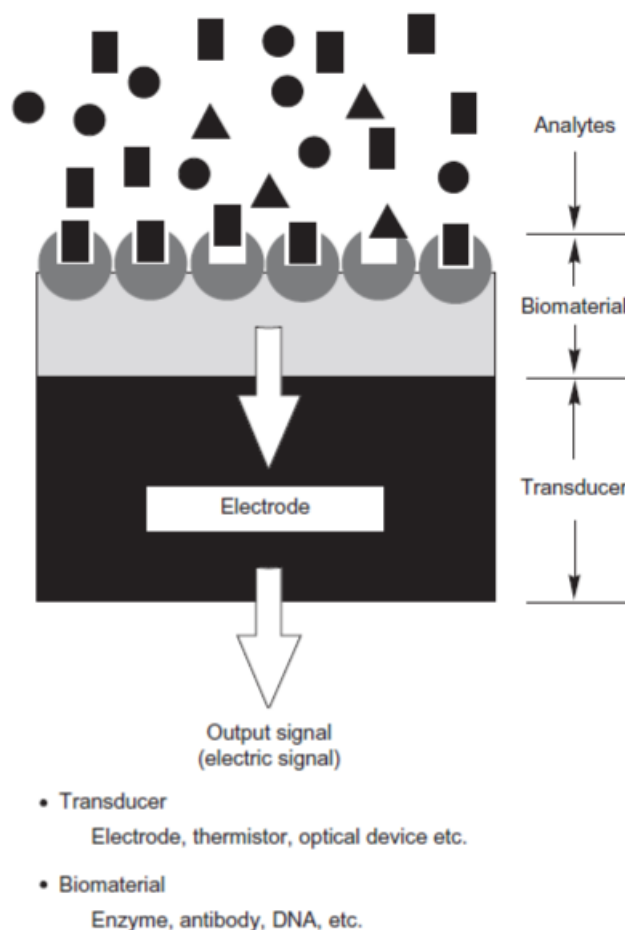
Τα συστήματα αισθητήρων χρησιμοποιούνται, γενικά, για τη διεξαγωγή ελέγχων και μετρήσεων. Ο όρος μορφομετατροπέας (transducer) χρησιμοποιείται τόσο για το τμήμα εισόδου, όσο και εξόδου του συστήματος αισθητήρων. Ο ρόλος του μορφομετατροπέα εισόδου είναι η συλλογή πληροφοριών για μια φυσική ή χημική ποσότητα από τον περιβάλλον. Σε αυτήν την περίπτωση, οι μορφομετατροπείς ονομάζονται αισθητήρες. Συχνά τα ηλεκτρικά σήματα που παράγονται από τους αισθητήρες είναι ασθενή και πρέπει να ενισχυθούν ή να υποστούν κάποιου είδους επεξεργασία. Αυτό γίνεται στο κομμάτι επεξεργασίας σήματος του συστήματος αισθητήρων.

Τέλος, ο ρόλος του μορφομετατροπέα εξόδου είναι η μετατροπή του ηλεκτρικού σήματος σε μια μορφή αντιληπτή από τις ανθρώπινες αισθήσεις, ή η ενεργοποίηση κάποιου γεγονότος. Στην περίπτωση αυτή, οι μορφομετατροπείς καλούνται ενεργοποιητές (actuators). Η ποσότητα εξόδου (σήμα εξόδου) των ενεργοποιητών έχει τη μορφή ενέργειας ή ισχύος (π.χ ηλεκτρική ενέργεια). Το σήμα εισόδου, αντίστοιχα ποικίλει ανάλογα με το αν ο αισθητήρας είναι φυσικός ή χημικός.

Ως χημικός αισθητήρας ορίζεται η διάταξη η οποία μετατρέπει μια χημική πληροφορία σε ένα αναλυτικώς χρήσιμο σήμα. Οι χημικές πληροφορίες, μπορεί να προέρχονται από μια χημική αντίδραση του αναλύτη ή από μια φυσική ιδιότητα του υπό εξέταση συστήματος. Οι χημικοί αισθητήρες προορίζονται κυρίως για την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των χημικών ουσιών που βρίσκονται κυρίως στην αέρια και την υγρή φάση και λιγότερο στην στερεά. (9)

Οι βιοαισθητήρες μπορούν να καταταχθούν στους χημικούς αισθητήρες και είναι αναλυτικές διατάξεις (analytical devices) οι οποίες αξιοποιούν είτε ένα βιολογικό υλικό (βιοσυστατικό) είτε ένα υλικό 'βιομιμητή' (biomimic) ως μόριο αναγνώρισης το οποίο είτε συνδέεται είτε ενσωματώνεται σε ένα φυσικοχημικό μεταλλάκτη σήματος (Εικόνα 6). Συνήθως στους βιοαισθητήρες ως στοιχείο βιολογικής αναγνώρισης χρησιμοποιείται

ένζυμο (ενζυμικός βιοαισθητήρας) ή βιολογικοί υποδοχείς όπως αντισώματα, κύτταρα ή ιστοί (βιοαισθητήρας συγγένειας). Ο συνήθης στόχος είναι η παραγωγή ενός ψηφιακού ηλεκτρονικού σήματος (Εικόνα 6), το οποίο είναι ανάλογο της συγκέντρωσης του συγκεκριμένου προς ανάλυση στοιχείου.



Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση ενός βιοαισθητήρα(58)

Το σήμα μπορεί να είναι αποτέλεσμα μεταβολής της συγκέντρωσης των πρωτονίων, της πρόσληψης ή απελευθέρωσης αερίων όπως το οξυγόνο και η αμμωνία, της εκπομπής φωτός, ανάκλασης ή απορρόφησης, θερμικής εκπομπής ή άλλων μηχανισμών που απορρέουν από τη δράση των μορίων-αισθητήρων. Αυτό το σήμα μπορεί στη συνέχεια να μετατραπεί από ένα μεταλλάκτη σήματος σε ένα μετρήσιμο φυσικοχημικό μέγεθος. Και το βιολογικό και το ηλεκτρικό σήμα μπορούν στη συνέχεια να αξιοποιηθούν περαιτέρω με ενίσχυση ή προώθηση.

Η ικανότητα ανάλυσης που παρέχουν οι βιοαισθητήρες έχει αυξηθεί περαιτέρω μέσω της ελάττωσης του μεγέθους τους και της βελτίωσης των δυνατοτήτων της

μικροηλεκτρονικής. Διαφορετικές φόρμες βιοαισθητήρων έχουν αναπτυχθεί για την ανάλυση ενός στόχου αλλά και για την καταγραφή μετρήσεων σε ευρύ φάσμα. (10)

2.1.2 Ιστορική εξέλιξη των βιοαισθητήρων

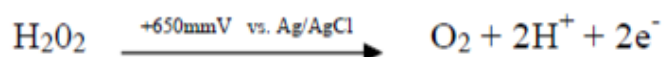
Το 1956, ο Clark δημοσίευσε ένα έγγραφο σχετικά με το ηλεκτρόδιο οξυγόνου. Μια μεμβράνη διαπερατή στο οξυγόνο, τοποθετήθηκε πάνω από ένα ηλεκτρόδιο εργασίας πλατίνας πολωμένο στα -700mV (vs. Ag/AgCl). Η ηλεκτροχημική αναγωγή του οξυγόνου στην επιφάνεια καθοδικά πολωμένου ηλεκτροδίου πλατίνας παράγαγε μια αμπερομετρική απόκριση, επιτρέποντας έτσι την ποσοτικοποίηση των επιπέδων οξυγόνου που υπάρχουν σε ένα δείγμα ιστού. (11)

Έπειτα, οι Clark και Lyons υπήρξαν πρωτοπόροι στη σύλληψη της έννοιας των βιοαισθητήρων με μία δημοσίευσή τους το 1962. Ειδικότερα, έκαναν αναφορά σε ένα ‘ενζυμικό ηλεκτρόδιο’ αποτελούμενο από ένα ακινητοποιημένο ένζυμο σε έναν ηλεκτροχημικό ανιχνευτή. Από τότε οι βιοαισθητήρες εξελίχθηκαν σημαντικά χάρη στην πρόοδο που πραγματοποιήθηκε στις τεχνολογίες ανίχνευσης και μετασχηματισμού σήματος. Στην Εικόνα 7 παρουσιάζεται μια ιστορική αναδρομή στην εξέλιξη των βιοαισθητήρων.

Έτος	Σημείωση σε σχέση με την εξέλιξη των βιοαισθητήρων
1916	Πρώτη αναφορά στην ακινητοποίηση πρωτεϊνών.
1922	Ηλεκτρόδιο υάλου για τη μέτρηση του pH
1956	Ηλεκτρόδιο του οξυγόνου (από τον Clark)
1962	Πρώτη περιγραφή βιοαισθητήρα: αμπερομετρικό ενζυμικό ηλεκτρόδιο για τη γλυκόζη
1969	Ποτενσιομετρικός βιοαισθητήρας: ακινητοποίηση ενζύμου σε ηλεκτρόδιο αμμωνίας για την ανίχνευση ουρίας
1970	Εύρεση Ion – Selective Field – Effect Transistor (ISFET)
1972 / 1975	Εμπορικός βιοαισθητήρας (Yellow Spring Instrument): Βιοαισθητήρας γλυκόζης
1980	Αισθητήρας pH για <i>in vivo</i> μετρήσεις αερίων αίματος
1982	Βιοαισθητήρας γλυκόζης (με οπτικές ίνες)
1983	Πρώτος ανοσοαισθητήρας SPR
1984	Αμπερομετρικός βιοαισθητήρας: οξειδάση γλυκόζης και φεροκενίου για την ανίχνευση γλυκόζης
1987	MediSense ExacTech: Βιοαισθητήρας ανίχνευσης γλυκόζης αίματος
1990	Εμπορικά διαθέσιμος βιοαισθητήρας του οίκου Pharmacia Biacore SRP
1992	i-STAT φορητός αναλυτής αίματος
1998	Βιοαισθητήρας γλυκόζης αίματος FastTake (LifeScan)
1999-σήμερα	Quantum dots, Νανουλικά (νανοσωματίδια, νανοσωλήνες κλπ.)

Εικόνα 7: Ιστορική εξέλιξη των βιοαισθητήρων(10)

Περαιτέρω μελέτη σε αισθητήρες για τη μέτρηση της γλυκόζης σε ιστούς και δείγματα αίματος είχε ως αποτέλεσμα την επιτυχή εφαρμογή ενός ενζυμικού ηλεκτροδίου σε ένα πρωτότυπο αναλυτή γλυκόζης αίματος από τον Reitnauer το 1972. Η αρχική ανίχνευση οξυγόνου, που αποδείχθηκε από τον Clark το 1962, βρέθηκε ότι είναι επιρρεπής σε μετατόπιση λόγω διακυμάνσεων των επιπέδων περιβαλλοντικού οξυγόνου. Για το λόγο αυτό, το 1974, η Yellow Springs Instrument Co. χρησιμοποίησε μια εναλλακτική μέθοδο ανίχνευσης για να παράγει τον πρώτο εμπορικό βιοαισθητήρα στον κόσμο για τον πλήρη προσδιορισμό της γλυκόζης στο αίμα, YSI 23A. Η πολικότητα στο ηλεκτρόδιο εργασίας αυτού του αναλυτή γλυκόζης, ήταν ανεστραμμένη και επομένως η ενζυμική παραγωγή του H₂O₂ θα μπορούσε να παρακολουθείται αμπερομετρικά.



Εικόνα 8: Αμπερομετρική ανίχνευση του υπεροξειδίου του υδρογόνου

Υπήρχαν ορισμένοι προβληματισμοί, όπως το γεγονός ότι το δυναμικό (+ 650mV) στο οποίο το ηλεκτρόδιο εργασίας ήταν πολωμένο θα μπορούσε να οξειδώνει άλλα ηλεκτροενεργά συστατικά του αίματος (π.χ. ασκορβικά ιόντα, ουρία) και να παράγει εσφαλμένες αποκρίσεις. Η Yellow Springs Instrument Co. ξεπέρασε αυτό το ζήτημα εισάγοντας ένα φράγμα για τον αποκλεισμό των παρεμβολών που τοποθετήθηκε μεταξύ του ενζυμικού στρώματος και του ηλεκτροδίου εργασίας και αποτελούνταν από μια ανιονική μεμβράνη οξικής κυτταρίνης που εμπόδιζε τη διέλευση ανιονικών διαλυμάτων μέσω ενός μηχανισμού αποκλεισμού φυσικών αλλαγών. Επιπλέον, ο βιολογικός αισθητήρας YSI 23A χρησιμοποιούσε μια εξωτερική μικροπορώδη πολυανθρακική μεμβράνη υπό τη μορφή φράγματος περιορισμού διάχυσης υποστρώματος για την πρόληψη του κορεσμού του ενζύμου και έτσι επιτρεπόταν η γραμμικοποίηση των αποκρίσεων του αισθητήρα σε μεγαλύτερο εύρος συγκεντρώσεων.

Οι Guilbault και Montalvo ήταν οι πρώτοι που περιέγραψαν λεπτομερώς ένα ποτενσιομετρικό ενζυμικό ηλεκτρόδιο, το 1969. Μελέτησαν έναν αισθητήρα ουρίας βασισμένο στην ουρεάση ακινητοποιημένη σε ένα ηλεκτρόδιο υγρής μεμβράνης για την επιλεκτική ανίχνευση αμμωνίου. Το 1975, ο βιοαισθητήρας εξελίχθηκε από τον Divies,

όπου πρότεινε την αξιοποίηση των βακτηρίων ως βιολογικά στοιχεία σε μικροβιακά ηλεκτρόδια για τη μέτρηση του αλκοόλ.

Το 1976, η La Roche παρήγαγε τον «Αναλυτή Lactate LA640», όπου το ένζυμο διαλύθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα και τοποθετήθηκε σε θάλαμο αντίδρασης ακριβώς μπροστά από το ηλεκτρόδιο, προκειμένου οι σιδηροεξακυανιούχες (hexacyanoferrate) να μεταφέρουν ηλεκτρόνια από την γαλακτική αφυδρογονάση στο ηλεκτρόδιο. Αν και αυτό δεν ήταν εμπορική επιτυχία την εποχή εκείνη, αποδείχθηκε εκ των υστέρων ένας σημαντικός πρόδρομος μιας νέας γενιάς βιοαισθητήρων και αναλυτών με εφαρμογή στον αθλητισμό και σε κλινικές εφαρμογές. Την ίδια χρονιά, ένας αισθητήρας NADH χρησιμοποιώντας μιτοχόνδρια κατασκευάστηκε από τους Guibault et al., ενώ οι πρώτοι ενζυματικοί αισθητήρες με θερμοδομετρική ένδειξη αναπτύχθηκαν το 1977 από τον Mosbach.

Οι φασματοφωτομετρικές τεχνικές χρησιμοποιήθηκαν για πρώτη φορά σε βιοαισθητήρες από τους Leubbers και Opitz το 1975. Προσφέρουν έναν ασυναγώνιστο βαθμό επιλεκτικότητας εκμεταλλευόμενοι μια σειρά οπτικών ιδιοτήτων, όπως η προσρόφηση, ο φθορισμός, φαινόμενα βιο / χημικωφωτάγεια και ανάκλασης. Οι Leubbers et al. εφάρμοσαν τον όρο optode για να περιγράψει έναν αισθητήρα οπτικών ινών ακινητοποιώντας ένα αντιδραστήριο στο τέλος μιας οπτικής ίνας για τη μέτρηση του διοξειδίου του άνθρακα ή του οξυγόνου. Επέτειναν περαιτέρω την έννοια για να δημιουργήσουν έναν οπτικό βιοαισθητήρα για το αλκοόλ ακινητοποιώντας αλκοολική οξειδάση στον οπτικό αισθητήρα οξυγόνου. Τα εμπορικά optodes παρουσιάζουν εξαιρετική απόδοση για *in vivo* μέτρηση του pH, pCO_2 και pO_2 , αλλά τα optodes ενζύμων δεν είναι ακόμη ευρέως διαθέσιμα.

Η ιδέα της κατασκευής άμεσων ανοσοενισχυτών με την τοποθέτηση αντισωμάτων σε ένα πιεζοηλεκτρικό ή ποτενσιομετρικό μορφοτροπέα είχε εξερευνηθεί από τις αρχές της δεκαετίας του '70. Οι Liedberg et al. περιέγραψαν τη χρήση συντονισμού επιφανειακών πλασμονίων (SPR) για την παρακολούθηση των αντιδράσεων συγγένειας σε πραγματικό χρόνο. Το BIAcore (Pharmacia, Σουηδία) που ξεκίνησε το 1990 βασίζεται σε αυτή την τεχνολογία. Ωστόσο, το πρώτο «άμεσο» ανοσοηλεκτρόδιο είχε ήδη συναρμολογηθεί από τη Janata το 1975. (12)

Στη σημερινή εποχή διατίθεται ένα ευρύ φάσμα βιολογικών και συνθετικών δεκτών και μεταλλακτών σήματος. Η συνηθέστερη προσέγγιση βασίζεται αρχικά στην επιλογή του προς ανάλυση στόχου (ή την προς ανάλυση ουσία) και στη συνέχεια του μορίου-δέκτη

που έχει την απαιτούμενη συγγένεια και εκλεκτικότητα με την προς ανάλυση ουσία. Η ανάπτυξη των βιοαισθητήρων, κατά κύριο λόγο, υπαγορεύτηκε από τις ανάγκες της ιατρικής διάγνωσης καθώς και η ταχεία ανάλυση των κλινικών δειγμάτων η οποία παρέχει τη δυνατότητα για παροχή καλύτερης φροντίδας στον ασθενή.

Οι βιοαισθητήρες, όμως, μπορεί να αξιοποιηθούν με επιτυχία και σε άλλους τομείς, όπως η κτηνιατρική, η αναπαραγωγή των ζώων, ο έλεγχος των τροφίμων και η προστασία του περιβάλλοντος. Στην αρχή, οι προσπάθειες επικεντρώθηκαν σε βιοαισθητήρες για την υγρή φάση, ωστόσο πρόσφατα άρχισαν να μελετώνται και περισσότερο ελκυστικά περιβάλλοντα, όπως η αέρια φάση και οι οργανικοί διαλύτες. Η βιομηχανία διαγνωστικών μέσων είναι πολυποίκιλη και εξυπηρετεί αγορές με απαιτήσεις για διαφορετικά προϊόντα. Οι κύριες παράμετροι που επηρεάζουν την αγορά είναι: η τιμή του εξοπλισμού και των αναλώσιμων για την εφαρμογή της μεθόδου, η ακρίβεια, η ευαισθησία, ο αριθμός των απαιτούμενων παραμέτρων για τη διενέργεια της μέτρησης, η ταχύτητα και η φορητότητα του εξοπλισμού.

Έως σήμερα έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία πολλές έρευνες σε σχέση με τους βιοαισθητήρες με διαφορετικές προσεγγίσεις στο θέμα της κατασκευής τους. Παρόλα αυτά, εξαιτίας του σημερινού περιβάλλοντος και τρόπου ζωής υπάρχει μια αυξανόμενη ανάγκη για περισσότερο εύχρηστες, σταθερές, γρήγορες και σχετικά οικονομικές τεχνολογίες.

2.1.3 Σχεδιασμός ενός βιοαισθητήρα

Όπως περιγράφεται συνοπτικά στον ορισμό του, ένας βιοαισθητήρας περιλαμβάνει πάντα ένα βιολογικό στοιχείο και ένα μορφοτροπέα. Το βιολογικό συστατικό μπορεί να είναι ένα ένζυμο, ένα αντίσωμα, ένα νουκλεϊνικό οξύ ή ακόμη και ένα πλήρες κύτταρο ή ιστός, δημιουργώντας διαφορετικές γενιές βιοαισθητήρων. Με τον ίδιο τρόπο, το στοιχείο του μετατροπέα ενός βιοαισθητήρα μπορεί να ποικίλει επίσης. Υπάρχουν πολλοί διαφορετικοί τρόποι μεταγωγής, που βασίζονται σε οπτικά, θερμικά, ακουστικά ή ηλεκτροχημικά μέσα. Μια περαιτέρω μελέτη που αξίζει να ληφθεί υπόψη κατά το σχεδιασμό ενός βιοαισθητήρα είναι η ακινητοποίηση του βιολογικού συστατικού στην

επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Οι τεχνικές ακινητοποίησης ποικίλουν ανάλογα με το είδος του βιολογικού στοιχείου σε κάθε βιοαισθητήρα.

Στην απλούστερη μορφή του, το κύκλωμα του βιοαισθητήρα αποτελείται από ένα ηλεκτρόδιο εργασίας (working) μαζί με το κατάλληλο αντίθετο ηλεκτρόδιο (counter) και το ηλεκτρόδιο αναφοράς (reference). Πολλές τεχνικές ανάκρισης του κυκλώματος είναι δυνατές. Ωστόσο, οι πιο χαρακτηριστικές είναι: α) η ποτενσιομετρική προσέγγιση που μετρά τη διαφορά δυναμικού που δημιουργείται μεταξύ δύο ηλεκτροδίων, β) η αμπερομετρική προσέγγιση που παρακολουθεί τη ροή ρεύματος μεταξύ των ηλεκτροδίων και γ) η αγωγιμομετρική προσέγγιση, όπου η διαμορφωμένη αγωγιμότητα των βιολογικών συστατικών παρακολουθείται εντός ενός πολυμερούς.

Έχοντας καταλήξει στη βιολογική οντότητα, την ανίχνευση και την τεχνική ανάκρισης, ένας εμπορικά επιτυχημένος βιοαισθητήρας πρέπει να πληροί ορισμένα κριτήρια. Για να είναι ανταγωνιστικός με τις υπάρχουσες τεχνικές, ένας βιοαισθητήρας θα πρέπει να σχεδιαστεί έτσι ώστε να προσφέρει μια απλοποιημένη προσέγγιση παρακολούθησης η οποία θα απαιτεί χαμηλό κόστος κατασκευής και λειτουργίας, παρέχοντας παράλληλα έναν ταχύ και ακριβή προσδιορισμό ενός βιολογικού παράγοντα σε ένα δείγμα καθώς και εξασφάλιση μεταξύ άλλων, της απαιτούμενης επιλεκτικότητας, αναπαραγωγιμότητας, ευαισθησίας και σταθερότητας.

Παρακάτω, αναφέρονται ορισμένα χαρακτηριστικά των αισθητήρων όταν το σύστημα του μετρούμενου μεγέθους και του αισθητήρα βρίσκεται σε ισορροπία, δηλαδή ο αισθητήρας δεν αντιλαμβάνεται κάποια μεταβολή του φυσικού μεγέθους.

- Η επιλεκτικότητα (selectivity) περιγράφει το βαθμό στον οποίο ένας αισθητήρας αποκρίνεται μόνο σε έναν αναλύτη, με ελάχιστη ή καθόλου παρέμβαση από χημικές ουσίες που δεν αποτελούν τον «στόχο». Είναι φανερή η δυσκολία του να κατασκευαστεί ένας απόλυτα επιλεκτικός αισθητήρας ο οποίος να μην δέχεται παρεμβολές οι οποίες επηρεάζουν την μέτρηση. Η ευαισθησία περιγράφει τις ελάχιστες συγκεντρώσεις ή αλλαγές συγκέντρωσης που μπορεί να ανιχνευτούν επιτυχώς και επανειλημμένα από έναν αισθητήρα.
- Η ακρίβεια (accuracy) αφορά την απόκλιση της πραγματικής τιμής της μετρούμενης ποσότητας από την τιμή που δίνει ο αισθητήρας. Ουσιαστικά αντιπροσωπεύει την ανακρίβεια της μέτρησης. Η ακρίβεια μπορεί να εκφραστεί ως απόλυτη τιμή του σφάλματος μέτρησης είτε ως ποσοστό της κλίμακας εισόδου είτε ως ποσοστό της κλίμακας εξόδου.

- Η ευαισθησία (sensitivity) δείχνει την ανταπόκριση του αισθητήρα σε μια δεδομένη μεταβολή του μετρούμενου μεγέθους. Οι μονάδες μέτρησης της ευαισθησίας διαφέρουν ανάλογα με τη φύση του αισθητήρα και τη μετρούμενη ποσότητα. Εάν η σχέση ανάμεσα στη μετρούμενη ποσότητα και την έξοδο είναι γραμμική, η ευαισθησία είναι μία για όλο το εύρος λειτουργίας, εάν όχι, τότε η ευαισθησία διαφέρει από περιοχή σε περιοχή. Ως προς την ευαισθησία στη θερμοκρασία, ένας αισθητήρας θα πρέπει να είναι αναισθητος στις μεταβολές της θερμοκρασίας του περιβάλλοντος λειτουργίας του.
- Η αξιοπιστία (reliability) ενός αισθητήρα είναι η ικανότητά του να πληροί τις τεχνικές προδιαγραφές όταν χρησιμοποιείται σε εφαρμογές κάτω από καθορισμένες συνθήκες. Εκφράζει δηλαδή την σταθερότητα και την εγκυρότητα των σημάτων εξόδου του αισθητήρα. Αναφέρεται και ως χρόνος λειτουργίας της συσκευής.
- Η επαναληψιμότητα (reproducibility) του αισθητήρα είναι ο βαθμός στον οποίο αυτή παράγει το ίδιο αποτέλεσμα, όταν σε διαφορετικές χρονικές στιγμές τροφοδοτείται με ακριβώς την ίδια είσοδο. Εκφράζεται σε απόλυτο νούμερο ή ποσοστό. Δεν πρέπει να συγχέεται με την ακρίβεια, αφού ένας αισθητήρας μπορεί να δίνει παρόμοια έξοδο πολλές φορές για συγκεκριμένη είσοδο, αλλά εάν υπάρχει σημαντικό σφάλμα, η έξοδος δεν είναι ακριβής.
- Η σταθερότητα (stability) είναι επίσης μια σημαντική έννοια που πρέπει να λαμβάνεται υπόψη κατά το σχεδιασμό ενός αισθητήρα, ειδικά αν ο αισθητήρας πρόκειται να χρησιμοποιηθεί για συνεχείς μετρήσεις. Όταν εκτίθενται σε σύνθετα διαλύματα, τα υλικά μπορούν να προσκολληθούν στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου με την πάροδο του χρόνου, με αποτέλεσμα τη μείωση της απόκρισης του αισθητήρα. Οι αισθητήρες απλής χρήσης παρακάμπτουν σε μεγάλο βαθμό αυτό το πρόβλημα.
- Το εύρος (range) ενός αισθητήρα δείχνει την ελάχιστη και την μέγιστη τιμή που μπορεί να μετρήσει.
- Ως διακριτική ικανότητα ορίζεται η μικρότερη αλλαγή της τιμής εισόδου που μπορεί να ανιχνεύσει η συσκευή. Εκφράζεται συνήθως ως προς το μικρότερο διάστημα που μπορεί να ανιχνευθεί ή μετρηθεί. Όσο μεγαλύτερη είναι η διακριτική ικανότητα ενός ενδείκτη, τόσο μικρότερο είναι το βήμα που μπορεί ο αισθητήρας να μετρήσει.

- Το στατικό σφάλμα (static error) το οποίο έχει σταθερή τιμή και υπεισέρχεται στη μέτρηση σε όλο το εύρος των τιμών εισόδου. Γνωρίζοντας την τιμή του μπορεί να αντισταθμιστεί και να μην επηρεάσει την ακρίβεια του συστήματος.
- Η υστέρηση (hysteresis) εκφράζει την απόκλιση της τιμής εξόδου για συγκεκριμένη τιμή του σήματος εισόδου, όταν η κατεύθυνση της μεταβολής στην είσοδο αντιστραφεί. Το σφάλμα που παράγεται με αυτόν τον τρόπο επηρεάζει την ακρίβεια της συσκευής. Παράγοντες που προκαλούν φαινόμενο υστέρησης είναι συνήθως η τριβή, η μηχανική τάση και οι αλλαγές στη δομή των χρησιμοποιούμενων υλικών.
- Η νεκρή ζώνη είναι το μέγιστο εύρος τιμών εισόδου για τις οποίες η τιμή εξόδου δεν μεταβάλλεται.
- Το κατώφλι είναι η ελάχιστη τιμή του σήματος εισόδου για την οποία το σήμα εξόδου του αισθητήρα είναι μη μηδενικό.
- Ολίσθηση (drift) είναι η αργή μεταβολή του σήματος εξόδου του αισθητήρα, ενώ το μετρούμενο φυσικό μέγεθος παραμένει σταθερό. Μπορεί να οφείλεται σε παράγοντες, όπως η θερμοκρασία λειτουργίας, υγρασία κλπ. Η μακροχρόνια ολίσθηση είναι η μεταβολή των χαρακτηριστικών του αισθητήρα με την πάροδο μεγάλου χρονικού διαστήματος και μπορεί να οφείλεται σε παράγοντες, όπως η διάβρωση τμημάτων του αισθητήρα, η ρύπανση του αισθητήρα, η γήρανση των υλικών κατασκευής κλπ.
- Ο χρόνος λειτουργίας ενός αισθητήρα αποτελεί ένδειξη του χρόνου κατά τον οποίο αυτός αναμένεται να λειτουργεί στα πλαίσια των προδιαγραφών του. Εκφράζεται σε μονάδες χρόνου ή με τον αριθμό των λειτουργιών ή των κύκλων λειτουργίας που μπορεί να διεκπεραιώσει με επιτυχία.
- Η αντιστρεψιμότητα (reversibility) στην εξάρτηση της απόκρισης του αισθητήρα από προηγούμενη έκθεσή του σε αναλύτες.
- Το όριο ανίχνευσης (Limit of Detection, LOD) σχετίζεται με τη χαμηλότερη συγκέντρωση ενός αναλύτη που μπορεί να ανιχνευτεί. Οι τιμές συγκέντρωσης πάνω από το όριο ανίχνευσης ενός αναλύτη δείχνουν την παρουσία του στο χώρο, ενώ για τιμές χαμηλότερες, η ουσία δεν είναι ανιχνεύσιμη.
- Ο χρόνος απόκρισης/ ανάκαμψης (response/recovery time) αναφέρεται συνήθως στο χρόνο που χρειάζεται ο αισθητήρας για να αποκτήσει το 70% της σταθερής τιμής του κατά την εμφάνιση/απομάκρυνση μιας ουσίας.

Βέβαια, για να μπορέσει ένας αισθητήρας να λειτουργήσει σωστά και να διεξαχθούν τα απαραίτητα αποτελέσματα απαιτείται η βαθμονόμησή του. Με τον όρο αυτό, αναφερόμαστε στη διαδικασία καθορισμού της συνάρτησης μεταφοράς ενός αισθητήρα ή γενικότερα ενός συστήματος μέτρησης. Η γνώση της συνάρτησης μεταφοράς του αισθητήρα είναι απαραίτητη κατά τη διαδικασία των μετρήσεων, έτσι ώστε μετρώντας την τιμή του ηλεκτρικού σήματος εξόδου που παράγει ο αισθητήρας να υπολογίζεται μέσω της συνάρτησης μεταφοράς και η αντίστοιχη τιμή του μετρούμενου μεγέθους.

Κατά τη διαδικασία της βαθμονόμησης εφαρμόζονται γνωστές τιμές του μετρούμενου φυσικού μεγέθους στον αισθητήρα και μετρώνται οι αντίστοιχες τιμές του ηλεκτρικού σήματος εξόδου του. Για παράδειγμα, η βαθμονόμηση ενός χημικού αισθητήρα επιτυγχάνεται με διαλύματα που περιέχουν γνωστές συγκεντρώσεις των ουσιών που επιθυμούμε να ανιχνεύσουμε. (13)

Σύμφωνα λοιπόν με όσα αναφέρθηκαν παραπάνω, η βέλτιστη λειτουργία ενός αισθητήρα επιτυγχάνεται όταν τα χαρακτηριστικά του λαμβάνουν ιδανικές τιμές, οι οποίες παρουσιάζονται συνοπτικά στον παρακάτω πίνακα.

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	ΙΔΑΝΙΚΗ ΤΙΜΗ
Απόκριση	Γραμμική
Αρχική τιμή εξόδου	Μηδέν
Χρόνος απόκρισης	Μηδέν
Εύρος συχνοτήτων	Άπειρο
Χρόνος ως το 90 %	Μηδέν
Ένδειξη πλήρους κλίμακας	Βαθμονομημένη μέγιστη έξοδος
Περιοχή λειτουργίας	Άπειρη
Ευαισθησία	Υψηλή και σταθερή
Διακριτική ικανότητα	Άπειρη

Πίνακας 1:Χαρακτηριστικά ιδανικού αισθητήρα(13)

Σε έναν όμως πραγματικό αισθητήρα η συμπεριφορά και τα χαρακτηριστικά του διαφέρουν αρκετά από τις ιδανικές τιμές. Οι αιτίες είναι τόσο τα κατασκευαστικά προβλήματα που προκύπτουν όσο και οι περιβαλλοντικοί παράγοντες, που επηρεάζουν τη λειτουργία του, επιπλέον αν ο αισθητήρας συνοδεύεται από κάποιο ηλεκτρονικό κύκλωμα,

τότε αυτό μπορεί επίσης να επιβάλλει περιορισμούς στην λειτουργία του. Αυτό λοιπόν που επιδιώκεται είναι η όσο το δυνατόν καλύτερη προσέγγιση των ιδανικών τιμών βελτιώνοντας ορισμένα χαρακτηριστικά που είναι υπεύθυνα για την αλλοίωση του σήματος εξόδου. Μερικά από αυτά αναφέρονται παρακάτω:

- έλλειψη γραμμικότητας
- μεγάλη απόκριση
- μικρή περιοχή λειτουργίας, επομένως περιορισμένο εύρος μετρήσεων και χαμηλή ευαισθησία
- θόρυβος, μεταφέρει λανθασμένη πληροφορία και περιλαμβάνεται στο σήμα εξόδου
- ολίσθηση της ευαισθησίας, φαινόμενο που προκαλεί μεταβολές στην έξοδο με την πάροδο του χρόνου
- υστέρηση, η οποία λόγω της απόκλισης τιμών που προκαλείται παράγει συστηματικό σφάλμα στην καμπύλη εισόδου – εξόδου
- παρεμβολή, η οποία αναφέρεται σε ευαισθησία της εξόδου σε εξωτερικές συνθήκες, όπως είναι η ακτινοβολία ή η θερμοκρασία
- γήρανση, που μπορεί να οδηγήσει σε μεταβολή της εξόδου σε σχέση με το χρόνο

Η απότομη αύξηση της νανοτεχνολογίας την τελευταία δεκαετία όπως επίσης και οι εξαιρετικά ενδιαφέρουσες ιδιότητες που παρουσιάζουν τα νανουλικά έχουν ως αποτέλεσμα τη βελτίωση των χαρακτηριστικών που αναφέρθηκαν όπως επίσης και το μεγάλο εύρος εφαρμογών τους. Η νανοτεχνολογία έχει καταστεί κορυφαία προτεραιότητα στον τομέα της έρευνας στις περισσότερες αναπτυγμένες χώρες του κόσμου και βρίσκει εφαρμογές όχι μόνο στους καθιερωμένους και παραδοσιακούς τομείς της μικροηλεκτρονικής αλλά εισχωρεί σε νέους όπως για παράδειγμα στη νάνο-ιατρική και αυτό οφείλεται στο εξαιρετικά μικρό μέγεθος που έχουν οι δομές της αλλά και στην ταυτόχρονη ανάπτυξη της έρευνας στον τομέα των υλικών, που επιτρέπει την δημιουργία δομών με καλύτερη ανθεκτικότητα στη φθορά που προκαλεί το περιβάλλον λειτουργίας και ο χρόνος.

2.1.4 Εφαρμογές βιοαισθητήρων

Οι βιοαισθητήρες, όπως αναφέρθηκε και στην ιστορική αναδρομή, βρίσκουν εφαρμογή σε πολλούς τομείς, όπως:

- Η γεωργία
- Η βιομηχανία και τεχνολογία τροφίμων (παραγωγή και ποιοτικός έλεγχος)
- Η κλινική διάγνωση και βιοϊατρική
- Η μικροβιολογία (ανίχνευση ιών και βακτηρίων)
- Ο ποιοτικός έλεγχος και η φαρμακευτική ανάλυση
- Κτηνιατρική διάγνωση
- Έλεγχος βιομηχανικών αποβλήτων
- Προσδιορισμός βιομηχανικών (τοξικών) αερίων
- Έλεγχος της ρύπανσης του πειβάλλοντος
- Ανίχνευση ουσιών χημικού ή βιολογικού πολέμου

Ιατρικές εφαρμογές

Η ανάγκη για φορητές και φθηνές αναλύσεις σωματικών υγρών (αίματος και ούρων) οδήγησε σε ταχεία επέκταση του πεδίου των βιοαισθητήρων και των εφαρμογών τους στην ιατρική. Ο μοναδικός, πλέον επιτυχημένος βιοαισθητήρας σήμερα, είναι χωρίς αμφιβολία το σύστημα μέτρησης της γλυκόζης. Πρόσφατα, ένας νέος μη επεμβατικός αισθητήρας που δεν απαιτεί δείγμα αίματος και λειτουργεί με τη μέτρηση της γλυκόζης στο αίμα με IR ακτινοβολία, το Diasensor 1000TM, είναι εμπορικά διαθέσιμος. Ωστόσο, οι βιοαισθητήρες δεν χρησιμοποιούνται μόνο για την παρακολούθηση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα. Έχουν ήδη χρησιμοποιηθεί για τη διάγνωση υπερβολικής δόσης ουσιών, διότι προσφέρουν ταχεία ανάλυση. Οι δυνατότητες είναι ατελείωτες, καθώς για κάθε ιατρική κατάσταση, με έναν ή περισσότερους βιοδείκτες που σχετίζονται με αυτή, μπορεί να αναπτυχθεί θεωρητικά ένας διαφορετικός αισθητήρας. Ένας από τις κύριες κατασκευές είναι οι ανοσοαισθητήρες για την ανίχνευση βιολογικών δεικτών, όπως το αντιγόνο καρκίνου των ωοθηκών (CA-125) και η βασική πρωτεΐνη μυελίνης (MBP).(10)

Εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων

Η ανίχνευση μολυσματικών ουσιών, όπως τοξίνες, παρασιτοκτόνα και μικροοργανισμοί, ήταν πάντα σημαντική για τη βιομηχανία τροφίμων. Επομένως, δεν αποτελεί έκπληξη το γεγονός ότι υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον για τις εφαρμογές βιοαισθητήρων σε αυτόν τον κλάδο. Μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν και για να εκτιμηθεί η φρεσκάδα των τροφίμων, του κρέατος και των ψαριών για παράδειγμα, ή να δοθεί ένας κατάλογος συστατικών που περιέχονται σε ένα τρόφιμο, όπως βιταμίνες, αλλεργιογόνα, γαλακτωματοποιητές και συντηρητικά. Για παράδειγμα, οι ηλεκτρονικές "μύτες" ή "γλώσσες" έχουν προκύψει ότι μπορούν να ανιχνεύσουν εκατοντάδες ενώσεις που συμβάλλουν σε ένα άρωμα ή γεύση. Επιπλέον, οι βιοαισθητήρες χρησιμοποιούνται ήδη για τη μέτρηση των επιπέδων αλκοόλης και ζάχαρης στις διαδικασίες ζύμωσης καθώς και για τον προσδιορισμό των επιπέδων πενικιλίνης στο γάλα. (12)

Περιβαλλοντικές εφαρμογές

Οι εφαρμογές των βιοαισθητήρων για την παρακολούθηση του περιβάλλοντος είναι ένας συνεχώς αναπτυσσόμενος τομέας δεδομένου ότι ο προσδιορισμός των ρύπων αέρα και νερού είναι ζωτικής σημασίας. Οι εφαρμογές περιλαμβάνουν την παρακολούθηση ζιζανιοκτόνων, παρασιτοκτόνων, εντομοκτόνων, λιπασμάτων, μαζί με ανόργανα ιόντα όπως νιτρικό, θειικό, φωσφορικό, κάλιο, φθοριούχο, νάτριο και φαινόλες. Ο ευρύτερα χρησιμοποιούμενος βιοαισθητήρας σε περιβαλλοντικές εφαρμογές, κατασκευάστηκε για τον προσδιορισμό της BOD (Biological Oxygen Demand). Αυτός ο τύπος αισθητήρα μετρά τη μείωση του οξυγόνου, που χρησιμοποιείται στην οξείδωση των οργανικών ρύπων που υπάρχουν σε ένα δείγμα, από μικροοργανισμούς όπως το *Clostridium butyricum* και το *Trichosporon cutaneu*. (12)

Εφαρμογές στην Άμυνα και την Ασφάλεια

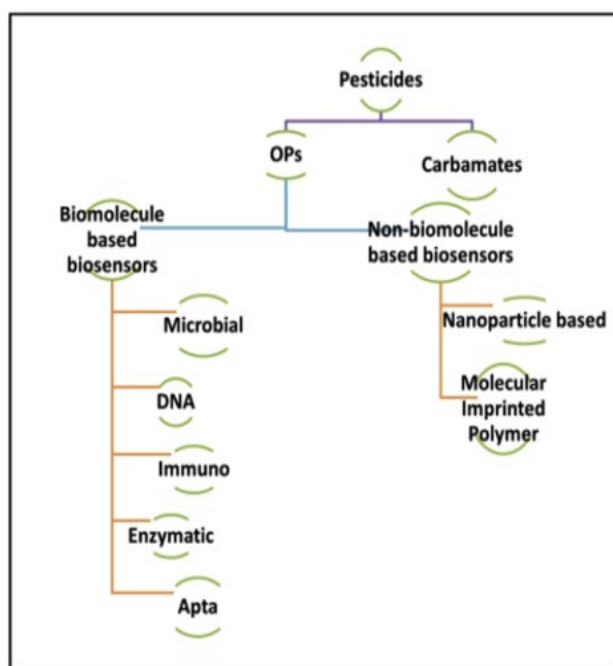
Οι χρήσεις των βιοαισθητήρων από το Στρατό και την Αστυνομία αποσκοπούν κατά κύριο λόγο στην ανίχνευση και την παρακολούθηση παραγόντων πολέμου όπως είναι τα τοξικά αέρια, καθώς και τα εκρηκτικά και τα παράνομα ναρκωτικά. Οι βιοαισθητήρες

μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για την παρακολούθηση παραγόντων βιολογικής απειλής όπως ο βάκιλλος του άνθρακα (νόσος anthrax) και η πανώλη, εντός ενός πλαισίου αντιτρομοκρατίας. (12)

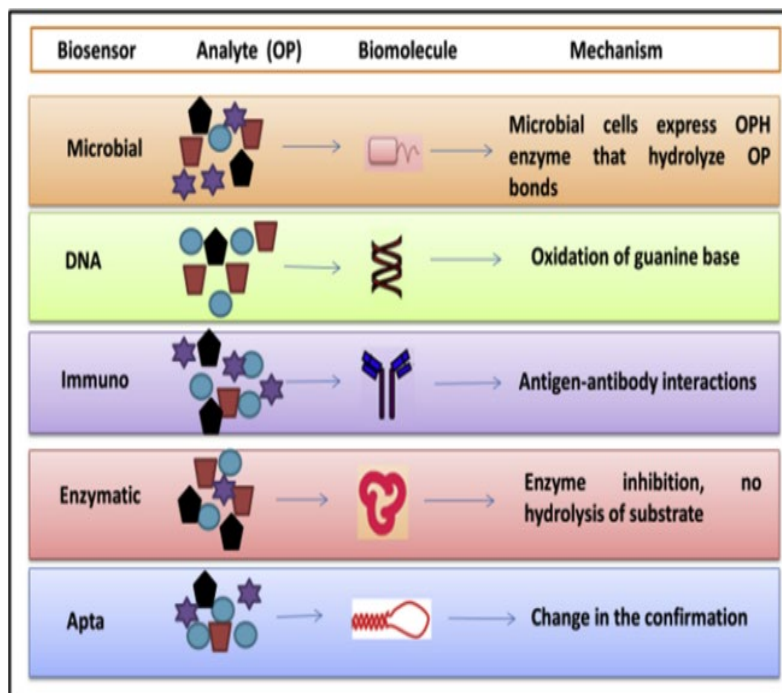
2.2 Ανίχνευση επιμολυντών στα τρόφιμα με τη χρήση βιοαισθητήρων

2.2.1 Βιοαισθητήρες για την ανίχνευση παρασιτοκτόνων

Σε μια δημοσίευσή του, ο Navpreet Kaur και η ομάδα του συγκέντρωσαν τα είδη βιομορίων που έχουν χρησιμοποιηθεί ως ηλεκτροχημικά συστήματα αίσθησης για την ανίχνευση οργανοφωσφορικών ενώσεων (Εικόνα 9). Αυτά μπορεί να είναι μικροβιακά κύτταρα, DNA, αντισώματα, ένζυμα και απταμερή, όπως φαίνεται στην Εικόνα 10.



Εικόνα 9: Κατηγορίες βιοαισθητήρων (14)



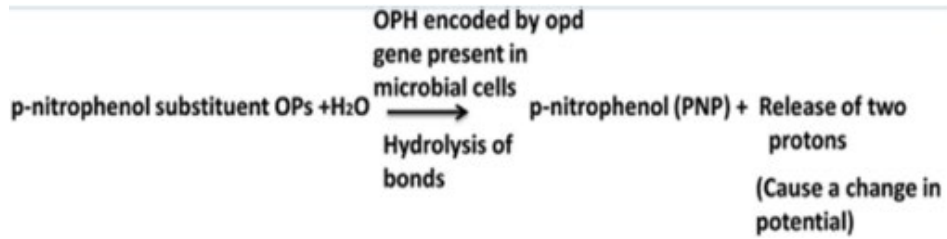
Εικόνα 10: Βιομόρια που χρησιμοποιούνται στους αισθητήρες(14)

2.2.1.1 Μικροβιακά κύτταρα

Οι βιοαισθητήρες που βασίζονται σε μικροβιακά κύτταρα ακινητοποιημένα στην επιφάνεια ενός αγωγίου υποστρώματος βρίσκονται σε στενή επαφή με έναν ηλεκτροχημικό μετατροπέα. Υπάρχουν δύο τρόποι με τους οποίους δουλεύουν οι μικροβιακοί βιοαισθητήρες:

1. Ποτενσιομετρία

Μικρόβια όπως το *Escherichia coli* κατασκευάστηκαν γενετικά ώστε να περιέχουν το υπερεκφραζόμενο ένζυμο οργανοφωσφορικής υδρολάσης (OPH) που κωδικοποιείται από το γονίδιο *opd*. Η OPH υδρολύει οργανοφωσφορικούς δεσμούς (όπως P-O, P-S, P-F και P-CN) και σχηματίζει ρ-νιτροφαινόλη (PNP) απελευθερώνοντας δύο πρωτόνια. Η απελευθέρωση των δύο πρωτονίων οδηγεί σε μεταβολή του δυναμικού που είναι γραμμικά ανάλογη με τη συγκέντρωση των οργανοφωσφορικών και αποτελεί την αρχή της κατασκευής ποτενσιομετρικών βιοαισθητήρων όπως φαίνεται στην παρακάτω αντίδραση.

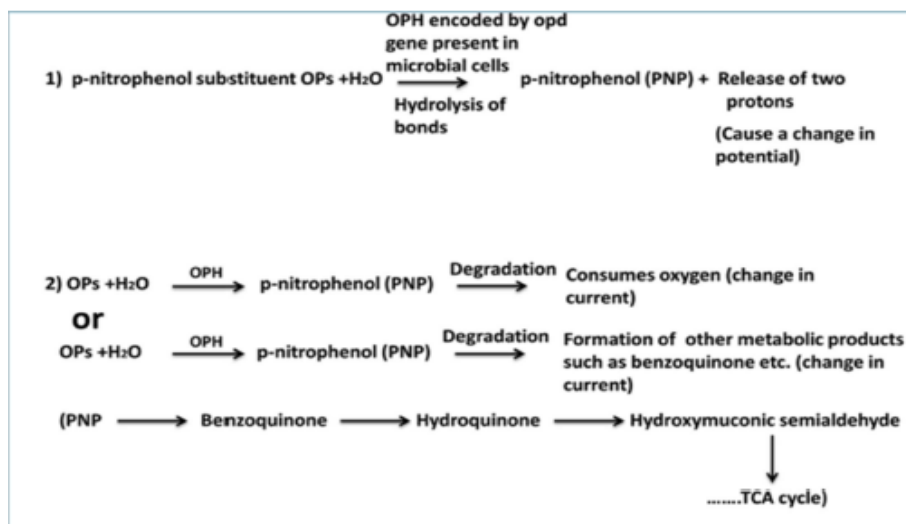


Εικόνα 11: Χημική αντίδραση που λαμβάνει χώρα σε ποτενσιομετρικό μικροβιακό αισθητήρα. (14)

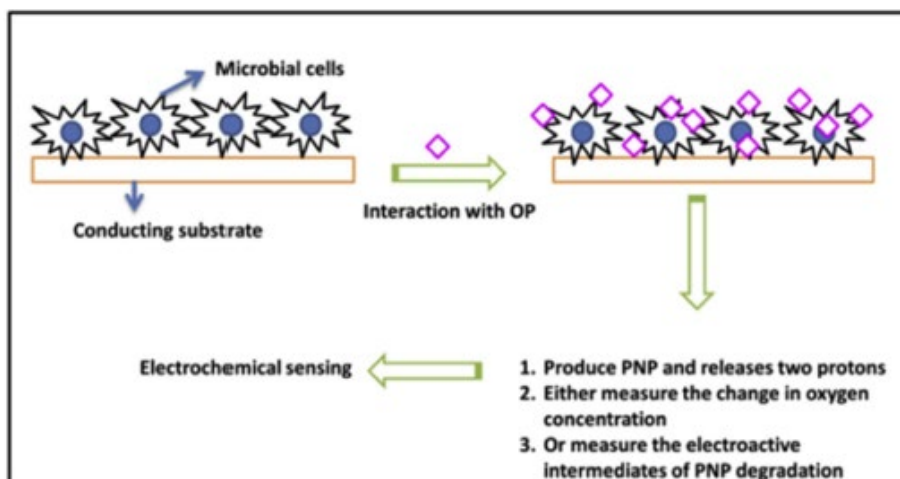
2. Αμπερομετρία

Η γενετικά εκφρασμένη OPH σε βακτήρια όπως τα *Arthrobacter*, *Flavobacterium* και *Pseudomonas putida* JS444 αποικοδομεί περαιτέρω την PNP μέσω του ενζυματικού της μηχανισμού, επομένως παρατηρείται μία μεταβολή στο ρεύμα οξείδωσης είτε λόγω της κατανάλωσης του οξυγόνου είτε λόγω της παραγωγής άλλων μεταβολικών προϊόντων της PNP (όπως βενζοκινόνη, υδροκινόνη κλπ.).

Στην Εικόνα 12 παρουσιάζονται οι χημικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα για το ηλεκτροχημικό σύστημα αίσθησης και στην Εικόνα 13 παρουσιάζεται σχηματικά η κατασκευή ενός τέτοιου αισθητήρα.



Εικόνα 12: Χημικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα σε αμπερομετρικό βιοαισθητήρα (14)



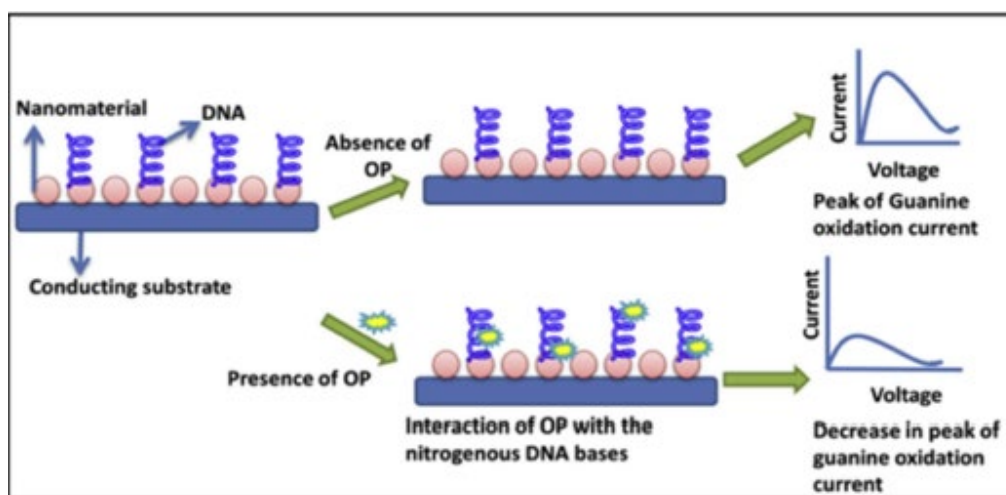
Εικόνα 13: Σχηματική επικόνιση ηλεκτροχημικού μικροβιακού αισθητήρα(14)

Στην ίδια δημοσίευσή του, ο Navpreet Kaur αναφέρει μια παλαιότερη έρευνα όπου παγιδευμένα κύτταρα *E. coli* που περιείχαν το πλασμίδιο pJK33 με εκφρασμένη την OPH χρησιμοποιώντας ηλεκτρόδιο PC και pH, ανίχνευσαν τα παραoxon, parathion, methyl parathion και diazinon μέχρι 3 μM . Ο μικροβιακός βιοαισθητήρας παρουσίασε καλή επαναληψιμότητα και σταθερότητα για τρεις ημέρες, αλλά χαμηλή ευαισθησία και αργή απόκριση, η οποία οφείλεται σε εμπόδια όπως η μεταφορά μάζας υποστρώματος και OPs διαμέσου των μεμβρανών. Αυτά ήταν τα κύρια πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα αυτών των βιοαισθητήρων. Η μακροπρόθεσμη σταθερότητα του βιοαισθητήρα θα μπορούσε να επιτευχθεί με την αντικατάσταση των μικροβιακών κυττάρων με εκείνα που υπερεκφράζουν άμεσα την OPH στην κυτταρική επιφάνεια.

Στην προσπάθεια να αντιμετωπιστούν οι παραπάνω περιορισμοί, κατασκευάστηκε ένας ποτενσιομετρικός μικροβιακός αισθητήρας με τη χρήση ανασυνδυασμένων κυττάρων *E. Coli* που αγκυροβολούν και εμφανίζουν την ενεργή OPH στην κυτταρική επιφάνεια. Ο βιοαισθητήρας έδειξε αυξημένο όριο ανίχνευσης (2 μM) και για τα τρία OPs (paraoxon, methyl parathion και diazinon), βελτιωμένο χρόνο απόκρισης (2 λεπτά) και σταθερότητα για πάνω από δύο μήνες. Επίσης, συνολικά ο αισθητήρας μείωσε το συνολικό κόστος και το πρόβλημα της μεταφοράς μάζας διαμέσου των μεμβρανών. (14)

2.2.1.2 DNA

Στους βιοαισθητήρες DNA, το DNA δρα ως μόριο αναγνώρισης και ακινητοποιείται στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας. Η μεταβολή των ιδιοτήτων οξειδοαναγωγής του DNA (κυρίως η οξείδωση της βάσης γουανίνης) παρακολουθείται για να μελετηθούν οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ του DNA και του αναλύτη. Η χρήση carbon paste ηλεκτροδίων ενισχύει την απόδοση του βιοαισθητήρα.



Εικόνα 14: DNA-βιοαισθητήρας(14)

Η ανίχνευση του malathion και του chlorpyrifos χρησιμοποιώντας DNA με παγιδευμένο polypyrrolepolyvinyl sulphonate (PPy/PVS) έχει μελετηθεί με όριο ανίχνευσης 0,0016 ppm για το chlorpyrifos και 0,17 ppm για το malathion εντός 30 s. Τα σύνθετα πολυανιλίνης (PANI)-PVS έχουν επίσης ερευνηθεί για την ανίχνευση του malathion και του chlorpyrifos χρησιμοποιώντας DNA-βιοαισθητήρα. Μέσα σε χρόνο απόκρισης 30 δευτερολέπτων, ο αισθητήρας εμφάνισε σταθερότητα περίπου 6 μηνών και όριο ανίχνευσης 0,5 ppb και 0,01 ppm για το chlorpyrifos και το malathion, αντίστοιχα.

Παρόλο που τα πολυμερή έχουν τα πλεονεκτήματα της υψηλής αντοχής σε ευλυγισία και ευκαμψία, αντιμετωπίζουν τους περιορισμούς του υψηλού κόστους, της δυσκολίας στην επεξεργασία και της μικρότερης μηχανικής σταθερότητας μετά το ντόπινγκ. Το κύριο εμπόδιο των βιοαισθητήρων βασισμένων σε DNA είναι η έλλειψη εξειδίκευσης καθώς οι αλληλεπιδράσεις πολλών αναλυτών με αζωτούχες βάσεις μεταβάλλουν την

ηλεκτροχημική απόκριση της βάσης γουανίνης του DNA. Ως εκ τούτου, ο κύριος περιορισμός των αισθητήρων DNA είναι η δυσκολία διάκρισης μεταξύ διαφόρων φυτοφαρμάκων, οργανοφωσφορικών ενώσεων και γονιδιοτοξικών ουσιών.

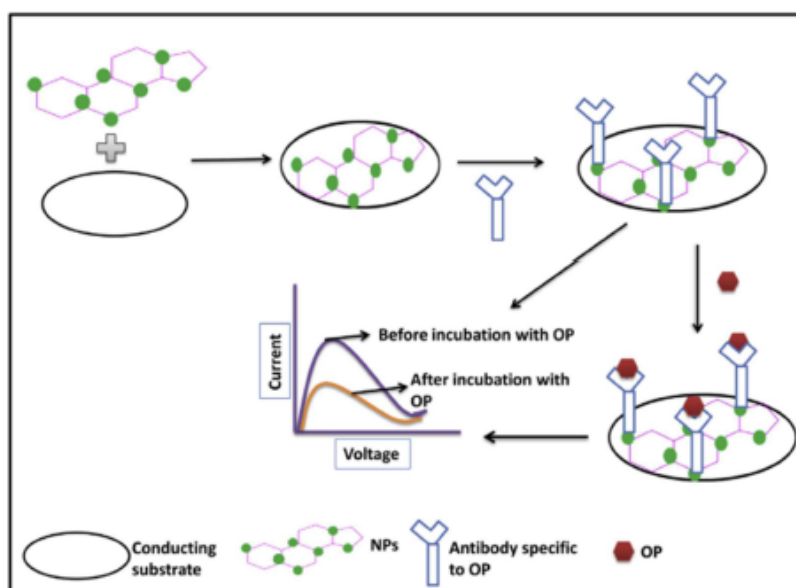
Ο άλλος περιορισμός είναι η αδυναμία επαναχρησιμοποίησης καθώς η οξειδωμένη βάση της γουανίνης δεν ανάγεται ξανά, καθιστώντας έτσι το βιοαισθητήρα μίας χρήσης. Η κατασκευή μικροβιακών και DNA βιοαισθητήρων, μέχρι σήμερα, εφαρμόζεται, ωστόσο αντιμετωπίζει περιορισμούς όσον αφορά το χρόνο απόκρισης, το κόστος, την έλλειψη επιλεκτικότητας και την επαναχρησιμοποίηση. Οι περιορισμοί αυτών των βιοαισθητήρων έχουν παρακινήσει τους ερευνητές να διερευνήσουν περαιτέρω νέα βιομόρια και τις στρατηγικές στην ανάπτυξη του βιοαισθητήρα. Η επιλεκτικότητα στο ευρύ φάσμα των OPs έχει επιτευχθεί με τη χρήση αντισωμάτων, ενζύμων και απταμερών.

2.2.1.3 Αντισώματα

Στους ανοσοαισθητήρες χρησιμοποιούνται αντισώματα εξαιρετικά επιλεκτικά σε διαφορετικά OPs τα οποία παράγουν αναλυτικά σήματα που ποικίλλουν με τις συγκεντρώσεις των οργανοφωσφορικών που θέλουμε να ανιχνεύσουμε. Η αντίδραση μεταξύ των OPs (ως αντιγόνων) και των αντισωμάτων περιλαμβάνει κυρίως υδρόφοβες, ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και δεσμούς υδρογόνου. Ένας ιδανικός αισθητήρας τέτοιου τύπου θα πρέπει επίσης να διαθέτει τις προδιαγραφές ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης των αντισωμάτων ακόμη και σε πραγματικά δείγματα. (15)

Τα ηλεκτροστατικά συνδεδεμένα με παραοxon ειδικά αντισώματα σε ηλεκτρόδιο από GCE τροποποιημένο με νανοσωματίδια χρυσού (AuNPs), ανίχνευσαν 12 µg/L παραοxon μετά από επώαση 30 λεπτών. Επίσης, αισθητήρες βασισμένοι σε μονού τοιχώματος νανοσωλήνες άνθρακα (SWCNTs / GCE) αναπτύχθηκαν για την ανίχνευση της ίδιας ουσίας. Τα μονοκλωνικά αντισώματα IgG ειδικά για την ανίχνευση του παραοxon είχαν ως αποτέλεσμα την εκτίμηση του γραμμικού εύρους (linear range) στα 2500-2 ppb και το χαμηλότερο όριο ανίχνευσης που επιτεύχθηκε ήταν 2 ppb (2 ng/mL). Ο αισθητήρας αξιολόγησε το παραοxon σε τέσσερα spiked δείγματα νερού σε περιβαλλοντικές συνθήκες. Το όριο ανίχνευσης και η ευαισθησία αυτού του είδους βιοαισθητήρα μπορούν να βελτιωθούν περαιτέρω χρησιμοποιώντας άλλα νανοϋλικά ή Carbon Paste με SWCNTs. Η

χρήση μικροηλεκτροδίων (IAMs) βρέθηκε ότι είναι εξαιρετικά αναπαράξιμη, σταθερή και ειδική για την ανάλυση του chlorpyrifos (0,014 ng/mL). (16)



Εικόνα 15: Λειτουργία βιοαισθητήρα βασισμένου σε αντισώματα(16)

Παρά τα οφέλη τους, οι αισθητήρες αυτού του είδους παρουσιάζουν και κάποια μειονεκτήματα όπως η πολυπλοκότητα, ο μεγάλος χρόνος ανάλυσης, ο εκτεταμένος χειρισμός των δειγμάτων, η δυσκολία διαθεσιμότητας, ο χρόνος και το κόστος δημιουργίας των μονοκλωνικών αντισωμάτων.

2.2.1.4 Ένζυμα

Οι ενζυμικοί βιοαισθητήρες είναι αναλυτικές συσκευές που συνδυάζουν το ένζυμο με τον μορφοτροπέα και μετατρέπουν το σήμα ανάλογο προς τη συγκέντρωση του αναλύτη στόχου / υποστρώματος με υψηλή καταλυτική δραστηριότητα, εκλεκτικότητα και ακρίβεια. Σε παρακάτω ενότητα, αναφέρονται αναλυτικότερα τα ένζυμα που έχουν χρησιμοποιηθεί σε βιοαισθητήρες. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, οι οργανοφωσφορικές και καρβαμικές ενώσεις θεωρούνται ότι είναι οι πιο ισχυροί αναστολείς της χολινεστεράσης (AChE / και BChE). Ο βασικός ρόλος της AChE είναι η υδρόλυση του νευροδιαβιβαστή ακετυλοθειοχολίνης (ATCh) προς θειοχολίνη (TCh) και οξικό οξύ στις χολινεργικές συνάψεις και τις νευρομυϊκές συνδέσεις. Η κύρια τοξική επίδραση των OPs είναι η μη αναστρέψιμη αναστολή της AChE η οποία προχωρεί μέσω του σχηματισμού ομοιοπολικού

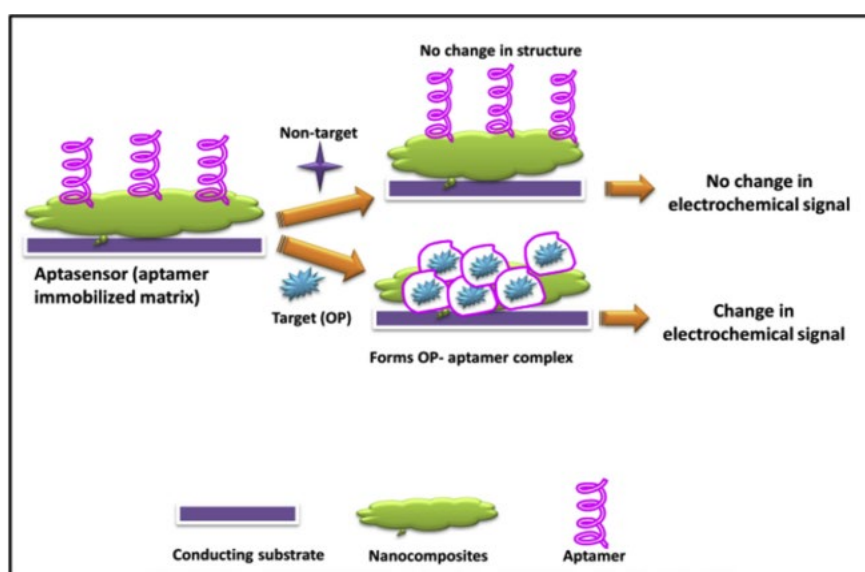
δεσμού στην ενεργό θέση της AChE, μειώνοντας έτσι την ενζυμική δραστηριότητα και προκαλώντας τελικά νευρική δυσλειτουργία. (17)

Έχουν διερευνηθεί διάφοροι τύποι ηλεκτροδίων ή/και υλικών για την ανάπτυξη βιοαισθητήρων βασισμένων σε AChE ή BChE για την ανίχνευση των OPs που θα περιγραφούν σε επόμενο εδάφιο.

2.2.1.5 Απταμερή

Τα απταμερή με κατάλληλες δευτερογενείς δομές σε συνδυασμό με διαφορετικά συστήματα μεταγωγής εμφανίζονται ως νέα αντιδραστήρια. Είναι μονοκλωνικά ολιγονουκλεοτίδια όπως μόρια ριβονουκλεϊκού οξέος (RNA), δεσοξυριβονουκλεϊκού οξέος (DNA) ή πεπτιδίων που διπλώνουν σε πολύπλοκη τρισδιάστατη δομή και δεσμεύονται με υψηλή συγγένεια και ακρίβεια σε έναν από τους στόχους τους. (18)

Τα απταμερή συντίθενται χημικά με μια τεχνική που ονομάζεται Systematic Evolution of Ligands με εκθετικό εμπλουτισμό (SELEX). Θεωρούνται ως βιολογικό υλικό για ιατρική διάγνωση, δοκιμές περιβαλλοντικής τοξικότητας, βιοαποτύπωση, χορήγηση φαρμάκων και θεραπεία κλπ. (19) Παράδειγμα αποτελεί η σύνδεση του απταμερούς DNA με molecular beacon (MB) είχε ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση ενός σήματος φθορισμού και την ανίχνευση τεσσάρων OPs (phorate, profenofos, isocarbophos και omethoate). (20)



Εικόνα 16: Απεικόνιση του μηχανισμού κατασκευής και ανίχνευσης των OPs με τη βοήθεια απταμερών

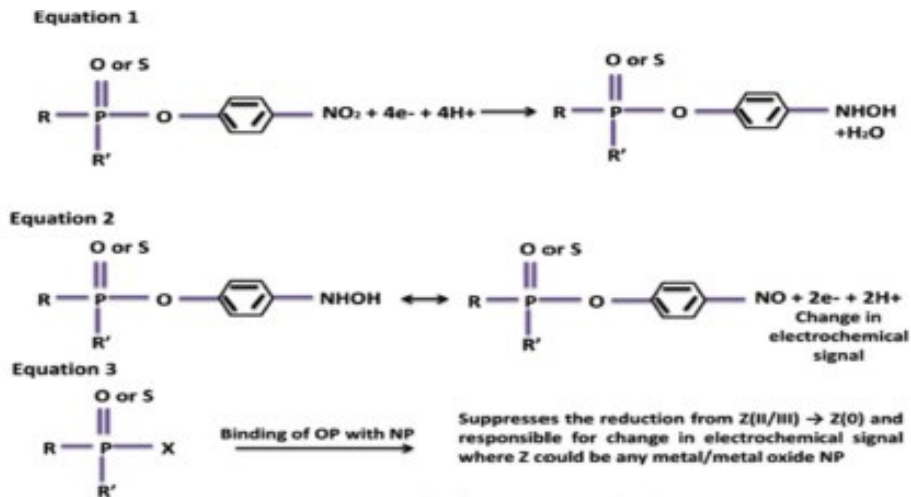
Τα όρια ανίχνευσης των isocarbophos, omethoate, phorate, και profenofos μέσω της τεχνικής Surface Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) βρέθηκαν να είναι 3,4 mM (1 ppm), 24 mM (5 ppm), 0,4 mM (0,1 ppm) και 14 mM (5 ppm) αντίστοιχα. Τα απταμερή έχουν ανοίξει το δρόμο στον τομέα των αισθητήρων που ονομάζονται aptasensors, αλλά υπάρχει πολύ λίγη βιβλιογραφία σχετικά με τους ηλεκτροχημικούς aptasensors κατά την ανίχνευση των OPs. (21)

Σύμφωνα με μια δημοσίευση (22), κατασκευάστηκε αισθητήρας βασισμένος σε απταμερή για την ανίχνευση του acetamiprid, όπου το απταμερές ήταν ακινητοποιημένο πάνω στην επιφάνεια ενός ηλεκτροδίου χρυσού ενισχυμένου με νανοσωματίδια χρυσού AuNPs/Au. Η γραμμική περιοχή που επιτεύχθη ήταν 5 με 600 nM με όριο ανίχνευσης 1nM. Η βελτίωση των ορίων ανίχνευσης μπορεί να επιτευχθεί χρησιμοποιώντας Carbon Paste ή άλλα πιο ηλεκτροενεργά νανοϋλικά. Η χρήση απταμερών για την ανίχνευση παρουσιάζει εξαιρετική ευαισθησία, σταθερότητα, όριο ανίχνευσης και έλλειψη ανοσογονικότητας. Η σύνθεση των απταμερών έχει χαμηλές διακυμάνσεις από παρτίδα σε παρτίδα που τα χαρακτηρίζει ως καλή επιλογή για την ανίχνευση οργανοφωσφορικών ενώσεων.

2.2.2 Άλλες τεχνικές ανίχνευσης

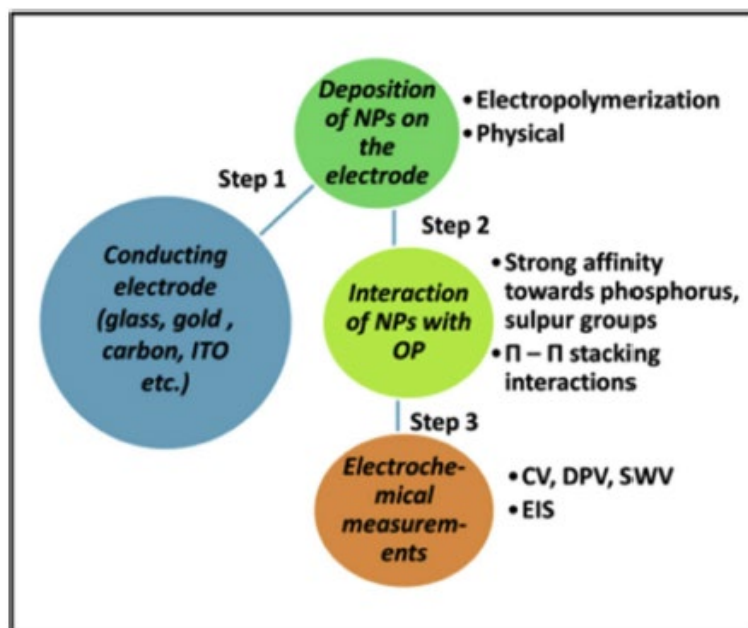
2.2.2.1 Αισθητήρες βασισμένοι σε νανοϋλικά

Αν και τα βιομόρια έχουν επιτυχώς ακινητοποιηθεί σε διαφόρων τύπων υποστρώματα και ηλεκτρόδια, είναι γνωστό ότι έχουν ορισμένα μειονεκτήματα όπως τον έλεγχο του μεγέθους και της θέσης του ακινητοποιημένου βιομορίου, των χρονοβόρων σταδίων παρασκευής, της μη ειδικής προσρόφησης, της μικρότερης σταθερότητας και της κακής αναπαραγωγιμότητας. Εναλλακτικά, έχουν χρησιμοποιηθεί αισθητήρες που δε χρησιμοποιούν βιομόρια για την ανίχνευση εντομοκτόνων και άλλων μολυσματικών ουσιών. Ορισμένα νανοσωματίδια (NPs) έχουν υψηλή συγγένεια με τις λειτουργικές ομάδες που υπάρχουν στη δομή των OPs, όπως η ομάδα -SH. Η οργανοφωσφορική ένωση δεσμεύεται από το νανοϋλικό και αναστέλλει την αναγωγή του (όπως το Z (II / III) στο Z (0)) που έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή στο ηλεκτροχημικό σήμα, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 17.



Εικόνα 17: Μηχανισμός ανίχνευσης των OPs χρησιμοποιώντας NP αισθητήρες

Στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 18) παρουσιάζονται σχηματικά τα βήματα για την προετοιμασία και κατασκευή των ηλεκτροχημικών αισθητήρων που βασίζονται σε νανοσωματίδια.



Εικόνα 18: Απεικόνιση των βημάτων κατασκευής ηλεκτροχημικού βιοαισθητήρα με την χρήση νανοσωματιδίων

Η ηλεκτροχημική ανίχνευση του methyl parathion, για παράδειγμα έχει γίνει και μέσω της χρήσης CPEs (carbon paste electrodes). Αυτά τα ηλεκτρόδια εμβαπτίστηκαν εντός του

ρυθμιστικού οξικού άλατος που περιείχε την επιθυμητή συγκέντρωση OP και αργότερα έγινε ανάλυση ηλεκτροχημικής απογύμνωσης για να ληφθεί το όριο ανίχνευσης του methyl parathion (0,05 $\mu\text{mol/L}$ εντός της περιοχής 1-60 μM). Το προσροφημένο methyl parathion σε CPEs υποβάλλεται μέσω των αντιδράσεων που φαίνονται στην Εικόνα 18 στην παραγωγή ηλεκτροχημικού σήματος.

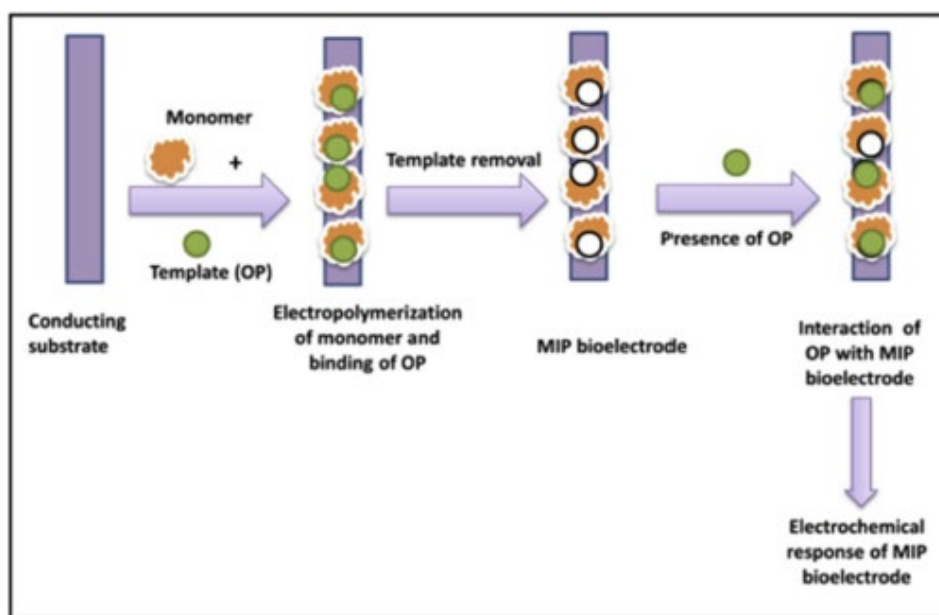
Τα νανοσωματίδια ζirkονίου (ZrO_2) παρουσιάζουν πλεονεκτήματα όσον αφορά την έλλειψη τοξικότητας και την υψηλή συγγένεια προς τις φωσφορικές ομάδες του μετρηθέντος methyl parathion στο εύρος συγκεντρώσεων 5-100 ng/mL (ppb) με όριο ανίχνευσης 3 ng/mL (14). Περαιτέρω, με τα ηλεκτρόδια ZrO_2/Au ανίχνευσαν το parathion με όριο ανίχνευσης 3 ng/mL σε συγκεντρώσεις εντός της περιοχής 20-140 ng/mL .(23) Σε παρόμοια έρευνα αναφέρθηκε πως η αντικατάσταση των ZrO_2 NPs με AuNPs έδειξε το ίδιο όριο ανίχνευσης. (24)

Τα AuNPs (νανοσωματίδια χρυσού) είναι το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο μεταλλικό νανοϋλικό, παρέχοντας καλή βιοσυμβατότητα, χημική σταθερότητα, εύκολη σύνθεση, μέγεθος και εξαρτώμενες από το σχήμα οπτικές ιδιότητες, δραστηριότητα σαν της υπεροξειδάσης και καλή αγωγιμότητα. Τα συστήματα των AuNPs χαρακτηρίζονται από μοναδικές ιδιότητες τοπικού συντονισμού επιφανειακών πλασμονίων (LSPR) και ιδιότητες σκέδασης φωτός συντονισμού (RLS). Το ενδιαφέρον της χρήσης AuNPs σε μεθόδους ηλεκτροχημικής ανίχνευσης συνίσταται στα συνδυασμένα αποτελέσματα της υψηλής αγωγιμότητας και της μεγάλης επιφάνειας που οδηγούν σε σημαντικά αυξημένη ευαισθησία της ηλεκτροχημικής ανίχνευσης, χωρίς να ξεχνάμε την απλότητα της σύνθεσης των νανοσωματιδίων και την εναπόθεσή τους μέσω ηλεκτροχημείας.

Σε σύγκριση με το χρυσό, τα NPs αργύρου έχουν ακόμα καλύτερες οπτικές ιδιότητες (υψηλοί συντελεστές απόσβεσης, οξείες ζώνες SPR) και ικανότητα ενίσχυσης σήματος, δηλαδή αυξημένη ένταση παρατηρείται στον φθορισμό μορίων που προσροφώνται ή δεσμεύονται στην επιφάνεια του NP, και ενισχυμένη σκέδαση Raman κοντά στην επιφάνεια του NP(SERS). Το ασήμι έχει τις υψηλότερες ηλεκτρικές και θερμικές αγωγιμότητες μεταξύ όλων των μετάλλων. Ωστόσο, η χημική αντιδραστικότητα και η τάση συσσώρευσης περιπλέκουν τις διαδικασίες σύνθεσης των AgNP και περιορίζουν τις τρέχουσες εφαρμογές τους. (25)

2.2.2.2 Μοριακά αποτυπωμένα πολυμερή (MIPs)

Η τεχνική των μοριακώς αποτυπωμένων πολυμερών (molecularly imprinted polymers) είναι μια συνθετική προσέγγιση για την αναγνώριση βιολογικών μορίων όπως οι ρύποι, οι οργανοφωσφορικές ενώσεις, τα αμινοξέα, τα φάρμακα κλπ. Η τεχνολογία τους βασίζεται στον σχηματισμό ενός πολυμερούς στην επιφάνεια ενός εκτυπωμένου ηλεκτροδίου. Τα κύρια πλεονεκτήματα των αισθητήρων MIPs είναι η επιλεκτικότητα και η συνάφεια για τα OPs. Η γενική διαδικασία περιλαμβάνει τη συγκρότηση των λειτουργικών μονομερών και του μίγματος (μήτρα) OP επί του αγώγιμου υποστηρίγματος διαμέσου ενός αποτελεσματικού διασυνδεδετικού μορίου. Ο πολυμερισμός του προκύπτοντος μίγματος και η απομάκρυνση της μήτρας φαίνεται στο παρακάτω σχήμα.



Εικόνα 19: Διαφορετικές φάσεις που εμπλέκονται στη διαδικασία μοριακής εκτύπωσης και ο μηχανισμός λειτουργίας ενός MIP

Σε μία δημοσίευσή του, ο Li και οι συνεργάτες του, αναφέρουν έναν ηλεκτροχημικό αισθητήρα MIP αποτελούμενο από AuNPs και νανοσωλήνες άνθρακα (CNTs), ακολουθούμενο από ηλεκτροπολυμερισμό της ο-υδροξυφαινόλης στην επιφάνεια του

AuNP / CNT / GCE. Ο αισθητήρας βρέθηκε να ανιχνεύει το triazophos και έχει υψηλή αναπαραγωγιμότητα και δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης (50 φορές). (26)

Ο Xue και οι συνεργάτες του, ανέπτυξαν έναν τέτοιου είδους αισθητήρα σε ντοπαρισμένα με άζωτο φύλλα γραφενίου με χρήση φαινόλης ως λειτουργικό μονομερές και methyl parathion ως πρότυπο. Οι αλληλεπιδράσεις υδρογόνου μεταξύ του ατόμου οξυγόνου στο methyl parathion συνδέθηκαν με τις ομάδες υδροξυλίου της φαινόλης. Το οργανοφωσφορικό προσδιορίστηκε στην κλίμακα 0.1-10 mg/mL με ένα όριο ανίχνευσης 0.01 mg/mL. (27)

Η μέθοδος MIP παρουσιάζει διάφορα πλεονεκτήματα καθώς αποτελείται από ειδικά σχεδιασμένα πολυμερικά υλικά. Ορισμένα από αυτά είναι η υψηλή εκλεκτικότητα, φυσικοχημική σταθερότητα, ευρωστία, μεγαλύτερη διάρκεια ζωής, επαναχρησιμοποίηση των υλικών και η ειδική αναγνώριση αναλυόμενης ουσίας και των δομικά συγγενών ενώσεων. (28) Είναι σταθερά στη φυσική και χημική επεξεργασία, συμπεριλαμβανομένης της θέρμανσης, των οξέων, των βάσεων κλπ. Η σταθερότητα και το χαμηλό κόστος των MIP τα καθιστούν πλεονεκτικά για χρήση στην εφαρμογή ανίχνευσης. Όμως μία δυσκολία είναι η απαίτηση μεγάλης ποσότητας οργανικού διαλύτη για την αφαίρεση του προτύπου αλλά κυριότερα, η δυσκολία ενσωμάτωσης τους σε ηλεκτροχημικές διατάξεις.

2.3 Βιομόρια που χρησιμοποιούνται σε βιοαισθητήρες για ανίχνευση φθαλικών ενώσεων

2.3.1 Απταμερή

Λόγω της ποικιλίας των φθαλικών εστέρων στο περιβάλλον, υπάρχει ζωτική ανάγκη να ανιχνευθεί η συνολική συγκέντρωσή τους με έγκαιρο και χαμηλού κόστους τρόπο. Για να εκπληρωθεί αυτή η απαίτηση, είναι επιθυμητό να χρησιμοποιηθούν ειδικά μόρια για την σύνδεση των PEs στον βασικό τους σκελετό. Τα απταμερή έχουν τις εξαιρετικά διατηρημένες πλούσιες σε κυτοσίνη αλληλουχίες και παρουσιάζουν τη γενική εξειδίκευση για τον βασικό σκελετό των PEs. Για την επιλογή του καταλληλότερου απταμερούς,

αποτελεί ουσιαστικής σημασίας τόσο η έκθεση της κοινής ομάδας των φθαλικών εστέρων στους υποδοχείς των απταμερών, όσο και η παρεμπόδιση των υπόλοιπων μερών που μπορεί να δεσμευθούν από τα απταμερή. Θεωρητικά, είτε η εστερική ομάδα φθαλικού οξέος είτε οι αλκυλικές αλυσίδες μπορούν να εκτεθούν μέσω του ορθολογικού σχεδιασμού των αρχικών στόχων. Οι εφαρμογές των απταμερών που δεσμεύουν τα PEs έχουν οδηγήσει στην ανάπτυξη δοκιμασιών υψηλής απόδοσης και ηλεκτροχημικών βιοαισθητήρων για την υπερευαίσθητη και εξαιρετικά ειδική ανίχνευση των PEs.

Εάν η εστερική ομάδα του φθαλικού οξέος εκτίθεται για τη δέσμευση απταμερούς, μπορούν να ληφθούν τα απταμερή ειδικά για αυτή την ομάδα. Για το σκοπό αυτό, η ομάδα πρόσδεσης πρέπει να εισαχθεί στο τέλος μίας αλυσίδας αλκυλίου. Η σχετική συγγένεια και εκλεκτικότητα των απταμερών για κάθε δείγμα ορίζεται ως η αναλογία του αριθμού των απταμερών στην ανάλυση του δείγματος με εκείνη του ρυθμιστικού διαλύματος. Συνεπώς, οι αναλογίες αντικατοπτρίζουν τόσο τη σχετική συγγένεια των απταμερών για διαφορετικές ομοειδείς φθαλικές ενώσεις όσο και την εκλεκτικότητα των απταμερών έναντι των πιθανών παρεμβολών. Όσο υψηλότερη είναι η αναλογία, τόσο μεγαλύτερη είναι η συγγένεια του απταμερούς για το εξεταζόμενο δείγμα.

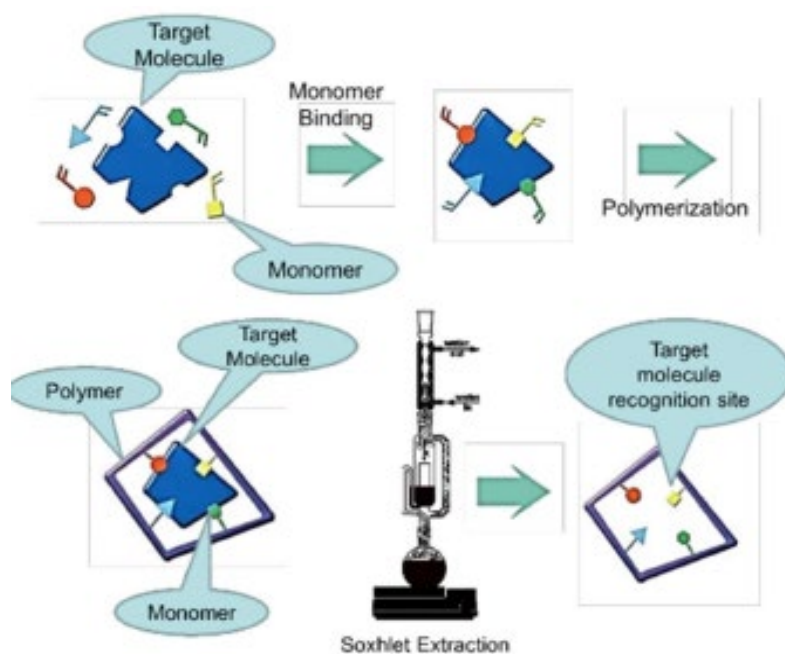
Σε μια δημοσίευσή του, ο Yu Han και οι συνεργάτες του, κατάφεραν να φτάσουν σε όριο ανίχνευσης για το DEHP στα 10 pM και σε δυναμική περιοχή 10 pM έως 100 nM. (29)

2.3.2 Μοριακά αποτυπωμένα πολυμερή (MIPs)

Όπως και για τις οργανοφωσφορικές ενώσεις, έτσι και για την ανίχνευση των φθαλικών εστέρων έχουν χρησιμοποιηθεί τα μοριακά εκτυπωμένα πολυμερή. Τα μοριακά εκτυπωμένα πολυμερή (MIP) είναι ειδικά σχεδιασμένα πολυμερικά υλικά που διαθέτουν πολύτιμες περιοχές αναγνώρισης μορίων στόχων, παρουσιάζοντας πλεονεκτήματα όπως υψηλή εκλεκτικότητα, φυσικοχημική σταθερότητα, ευρωστία, μεγαλύτερη διάρκεια ζωής, επαναχρησιμοποίηση και ειδική αναγνώριση αναλυόμενης ουσίας και δομικά συγγενών ενώσεων.

Σε σχετική έρευνα αναφέρεται ένα σύστημα MIP για επιλεκτική ανίχνευση του DEHP, που συντέθηκε με πολυμερισμό εναιωρήματος χρησιμοποιώντας μεθακρυλαμίδιο ως

λειτουργικό μονομερές που συνδέεται με το μόριο του DEHP μέσω δεσμών υδρογόνου. Το N,N-μεθυλενο-δισ-ακρυλαμίδιο χρησιμοποιήθηκε ως παράγοντας σχηματισμού σταυροδεσμών για την αντίδραση πολυμερισμού. Το υπερθειικό αμμώνιο χρησιμοποιήθηκε ως εκκινητής για τη σύνθεση του πολυμερούς. (5)



Εικόνα 20: Διαδικασία σύνθεσης των MIPs (30)

Ο αναλύτης θα μπορούσε να παγιδευτεί με MIP είτε με ομοιοπολική ή μη ομοιοπολική σύνδεση, η οποία είναι αποδεκτή ως η καθιερωμένη τεχνική για τη σύλληψη της αναλυόμενης ουσίας για καθαρισμό του δείγματος. Η μη ομοιοπολική σύνδεση κάνει χρήση σχετικά ασθενών δυνάμεων όπως η δέσμευση με υδρογόνο, το ζεύγος ιόντων, οι αλληλεπιδράσεις δίπολου-δίπολου ή οι δυνάμεις van der Waals για την παγίδευση μορίων στόχου. Αυτή η προσέγγιση εκτιμάται περισσότερο επειδή απαιτεί ελάχιστες προσπάθειες για την απομάκρυνση των μορίων στόχων από τις θέσεις αναγνώρισης, ενώ η ομοιοπολική παγίδευση απαιτεί μεταφορά ενέργειας για να σπάσει ο δεσμός για να αφαιρεθεί ο αναλύτης.

Τελικά, το όριο ανίχνευσης του DEHP δεν ήταν δυνατό να πέσει κάτω από 1ppm με αυτή την τεχνική. Επομένως, διαπιστώνεται ότι δεν είναι δυνατή η ανίχνευση χαμηλών συγκεντρώσεων των φθαλικών ενώσεων.

2.4 Επιλογή κατάλληλου συστήματος ανίχνευσης φυτοφαρμάκων

Από τις παραπάνω ενότητες προκύπτει ότι όλες οι μέθοδοι και τα βιομόρια που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση φυτοφαρμάκων και παρασιτοκτόνων έχουν και πλεονεκτήματα αλλά και αρκετά μειονεκτήματα. Στα πλαίσια της παρούσης Διπλωματικής Εργασίας μελετήθηκε η χρήση ενζύμων για την ανίχνευση οργανοφωσφορικών φυτοφαρμάκων μιας και είναι τα πιο συμβατά με την κατασκευή ηλεκτροχημικών αισθητήρων. Η καταλυτική τους δράση συνεπάγεται την παραγωγή ηλεκτρονίων κάτι που μεταβάλλει το ρεύμα στο κλειστό κύκλωμα του ηλεκτροδίου κι έτσι μπορεί να ανιχνευθεί αμπερομετρικά.

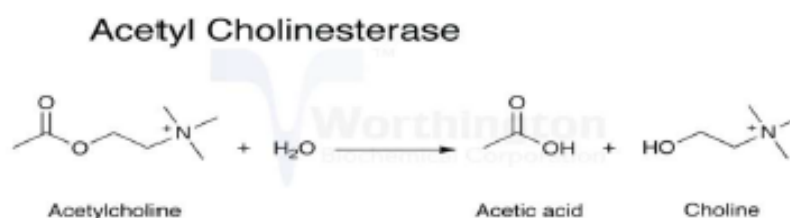
Εν αντιθέσει, μόρια όπως τα αντισώματα ή τα απταμερή όταν αναγνωρίζουν τον αναλύτη στόχο τους δεν αποδεσμεύουν ηλεκτρόνια αλλά ούτε καταναλώνουν και κατά συνέπεια για την χρήση τους στην κατασκευή ενός ηλεκτροχημικού αισθητήρα απαιτείται η περαιτέρω τροποποίησή τους ή η ενσωμάτωσή τους σε περίπλοκες δομές έτσι ώστε να εξασφαλίζεται η ηλεκτρονική δραστηριότητά τους παρουσία του αναλύτη στόχου τους. Πέραν τούτου, τα ένζυμα έχουν εκ φύσεως την ικανότητα να πολλαπλασιάζουν και να ενισχύουν μια αντίδραση επιτρέποντας την επίτευξη ακόμη χαμηλότερων ορίων ανίχνευσης μια συγκεκριμένης ουσίας. Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι η χρήση των βιοαισθητήρων με βάση τα ένζυμα παρέχει αρκετά πλεονεκτήματα, όπως το χαμηλό κόστος και η απλότητα της χρήσης της διάταξης σε συνδυασμό με την άμεση λήψη αποτελεσμάτων. Οι βιοαισθητήρες, λοιπόν, που χρησιμοποιούν ακινητοποιημένα ένζυμα έχουν τη δυνατότητα να συμπληρώσουν ή να αντικαταστήσουν τις κλασσικές αναλυτικές μεθόδους, απλοποιώντας ή εξαλείφοντας την προετοιμασία του δείγματος διευκολύνοντας και επιταχύνοντας τον έλεγχο με σημαντική μείωση του κόστους ανά ανάλυση. (31)

Το βασικό μειονέκτημα των ενζύμων είναι ότι μπορούν να ανασταλούν από μεγάλο αριθμό διαφορετικών ενώσεων, συμπεριλαμβανομένων κατιόντων μετάλλων, άλλων ανόργανων ειδών και οργανικών ενώσεων διαφορετικών από τον επιθυμητό αναλύτη. Αποκτά ιδιαίτερη σημασία λοιπόν ο έλεγχος της δραστικότητάς τους τόσο σε σύνθετα διαλύματα που προσομοιάζουν τα πραγματικά ενώ εξίσου σημαντική είναι η διερεύνηση της λειτουργικότητας των ενζύμων σε διαφορετικές συνθήκες φύλαξης. Πέραν αυτών, και καθώς πολλά φυτοφάρμακα αναστέλλουν την AChE και την BuChE, η εξειδίκευση που μπορεί να επιτευχθεί είναι φτωχή και η ταυτοποίηση των ενώσεων σε πραγματικά δείγματα

θεωρείται δύσκολη. Για τον σκοπό αυτό αξίζει να σημειωθεί ότι χρησιμοποιούνται σύνθετες τεχνικές χημειομετρίας που εν μέρει έχουν την δυνατότητα να επιλύσουν το πρόβλημα της μη επιλεκτικότητας των ενζύμων για κάθε μία ένωση που ανήκει στην οικογένεια των οργανοφωσφορικών και καρβαμικών φυτοφαρμάκων.

2.4.1 Ακετυλοχολινεστεράση (AChE)

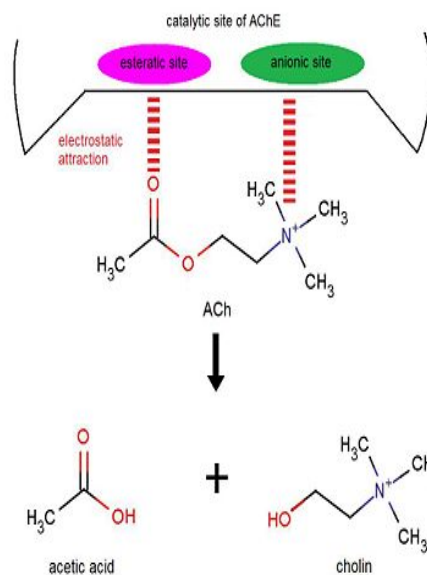
Οι ακετυλοχολινεστεράσες (AChE) είναι μια κατηγορία ενζύμων που καταλύουν την υδρόλυση της ακετυλοχολίνης, ενός εστέρα που λειτουργεί ως νευροδιαβιβαστής. Η χημική αντίδραση που λαμβάνει χώρα φαίνεται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 21: Η χημική αντίδραση που καταλύει η AChE

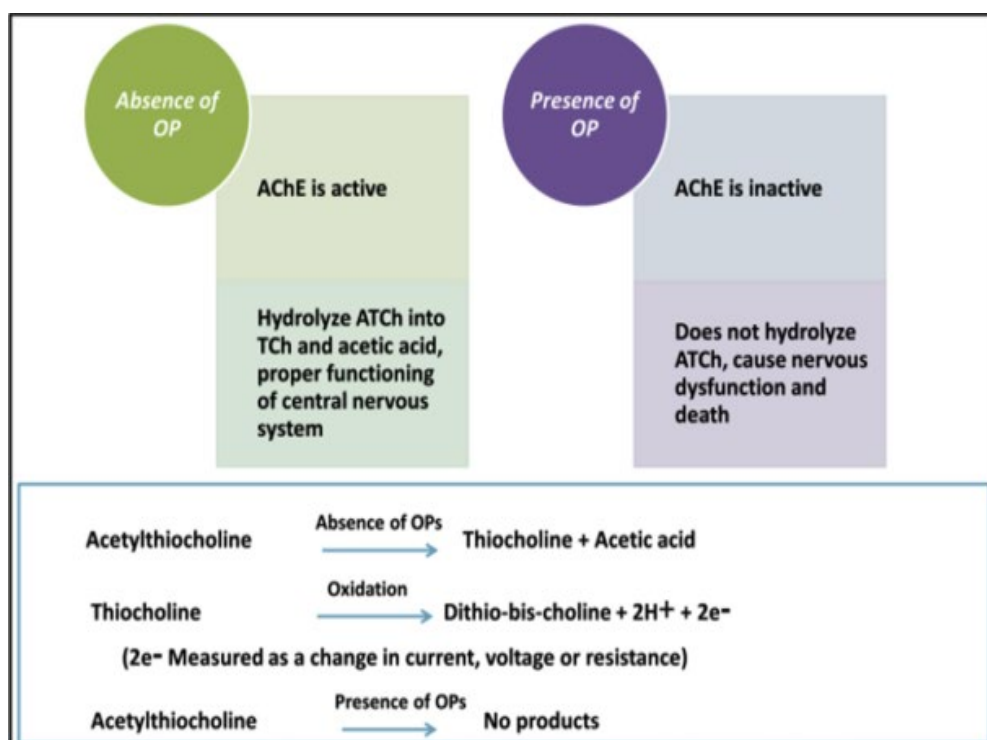
Τρία μέρη στη δομή του ενζύμου παίζουν βασικό ρόλο στη μετατροπή του υποστρώματος και / ή στην αλληλεπίδραση με τους αναστολείς: η ενεργός θέση, ο αρωματικός δακτύλιος και η περιφερειακή β-ανιονική θέση. Η περιφερειακή ανιονική θέση και ο αρωματικός δακτύλιος αντιπροσωπεύουν ένα φραγμό σε ανεπιθύμητα υποστρώματα και κάθε υπόστρωμα πρέπει να περάσει μέσα από αυτά στο δρόμο προς την ενεργό περιοχή. Η περιφερειακή ανιονική θέση βρίσκεται στην επιφάνεια του ενζύμου. (40)

Ουσιαστικά, η δράση της AChE είναι να σπάει τον εστερικό δεσμό της ακετυλοχολίνης (ACh) σχηματίζοντας οξικό οξύ και χολίνη όπως φαίνεται στην Εικόνα 32 πιο αναλυτικά.



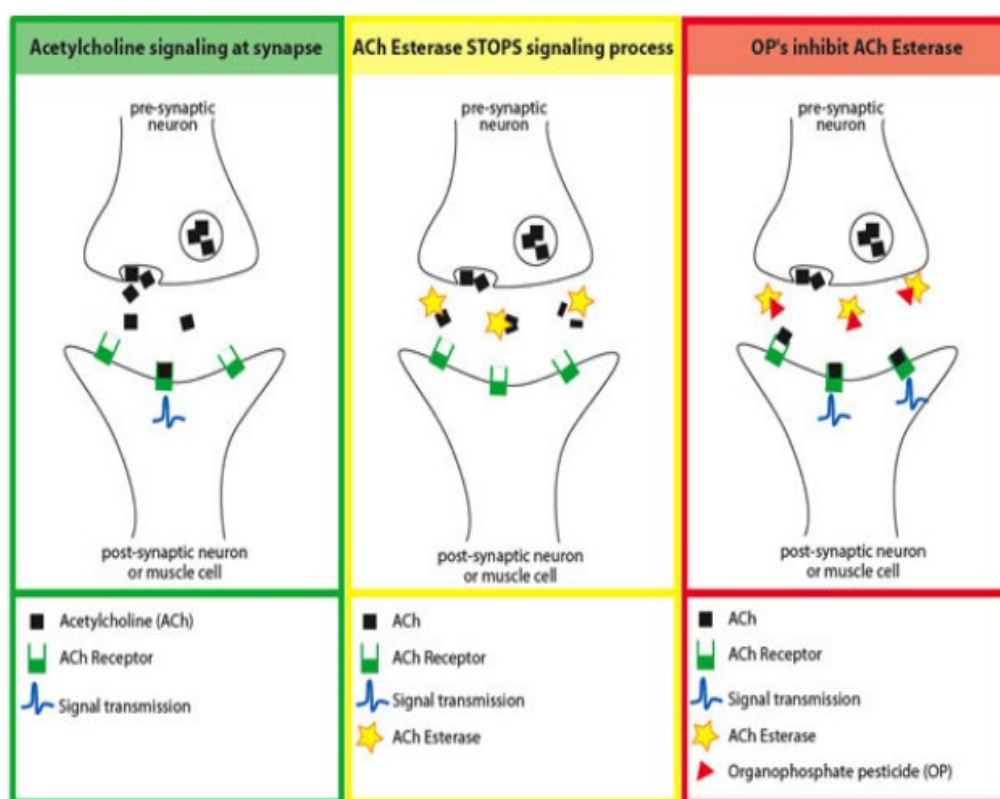
Εικόνα 22: Σχηματική απεικόνιση της δράσης της AChE χωρίς την παρουσία οργανοφωσφορικών(41)

Στην επόμενη εικόνα παρουσιάζεται συνοπτικά η δράση του ενζύμου απουσία και παρουσία των οργανοφωσφορικών ενώσεων.



Εικόνα 23: Δράση της AChE απουσία και παρουσία των οργανοφωσφορικών ενώσεων(15)

Η AChE είναι παρούσα σε θηλαστικά, πουλιά, ψάρια, ερπετά και έντομα. Η αναστολή της από τα οργανοφωσφορικά λαμβάνει χώρα ως αποτέλεσμα της φωσφορυλίωσης του υπολείμματος σερίνης στην ενεργό θέση του ενζύμου και έχει ως αποτέλεσμα τη διακοπή της μετάδοσης του νευρικού παλμού. Με αυτόν τον τρόπο προκαλείται συσσώρευση ακετυλοχολίνης στις νευρικές συνάψεις, η οποία παρεμβαίνει στις μυϊκές αποκρίσεις και προκαλεί αναπνευστική και μυοκαρδιακή βλάβη ή ακόμη και θάνατο. Η δράση του ενζύμου στις νευρικές συνάψεις απεικονίζεται παρακάτω.

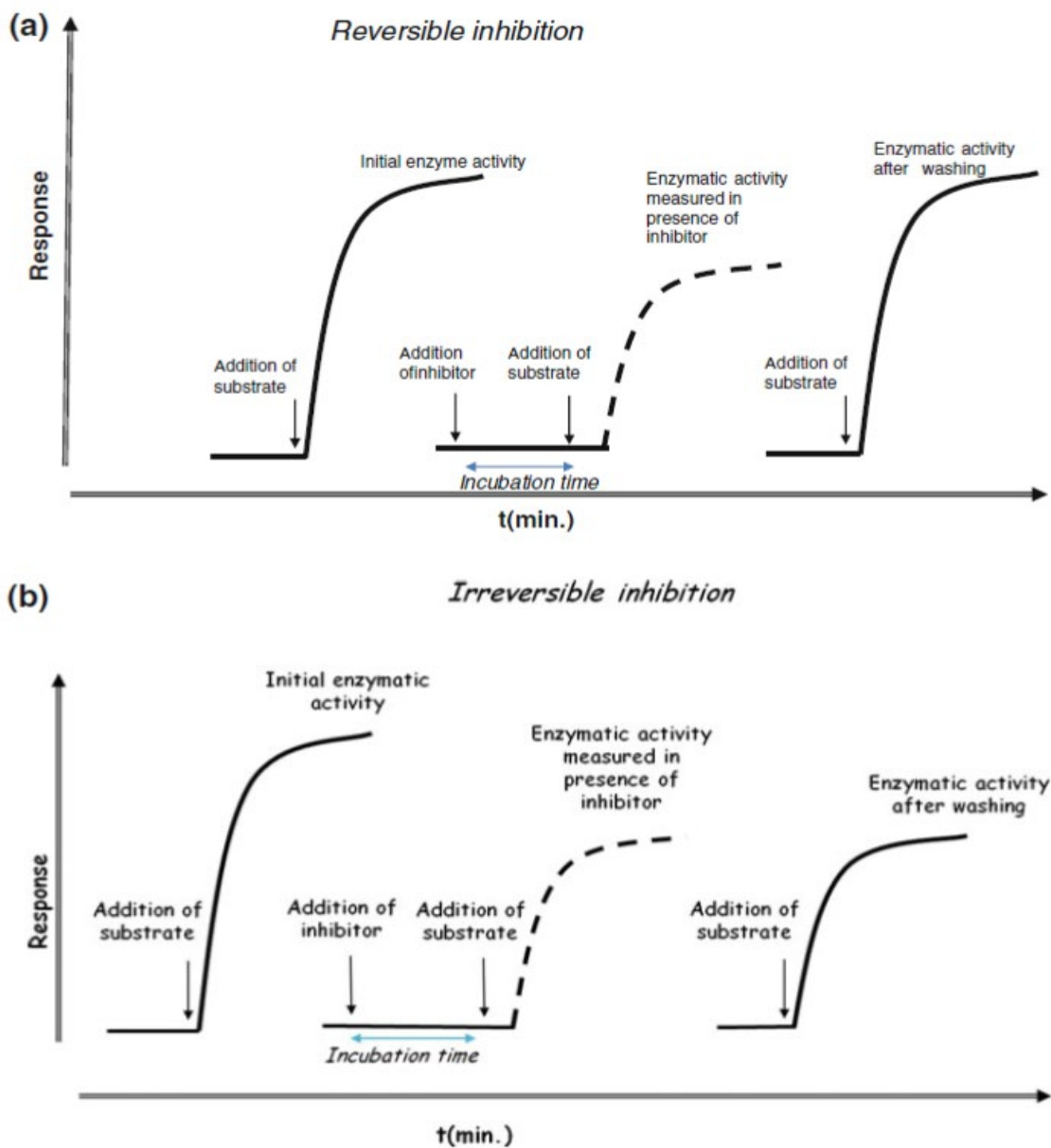


Εικόνα 24: Δράση της AChE στις νευρικές συνάψεις (42)

Το φωσφορυλιωμένο ένζυμο είναι εξαιρετικά σταθερό και η υδρόλυση της ακετυλοθειοχολίνης παρουσία των οργανοφωσφορικών ή καρβαμικών ουσιών, παρεμποδίζεται. Ανάλογα με τη χημική δομή του φυτοφαρμάκου, η φωσφορυλίωση, και επομένως η αναστολή, μπορεί να είναι αναστρέψιμη ή μη. Η αναστρέψιμη αναστολή χαρακτηρίζεται από μη ομοιοπολική αλληλεπίδραση μεταξύ ενζύμου και αναστολέα, με επακόλουθη αποκατάσταση της αρχικής δραστηριότητας μετά τη μέτρηση της αναστολής. Αντιθέτως, στην περίπτωση της μη αναστρέψιμης αναστολής που χαρακτηρίζεται από ομοιοπολική σύνδεση μεταξύ του ενζύμου και του αναστολέα, η αποκατάσταση της

αρχικής δραστηριότητας απαιτεί την επανενεργοποίηση του ενζύμου χρησιμοποιώντας κατάλληλες ενώσεις (enzyme regeneration). (56)

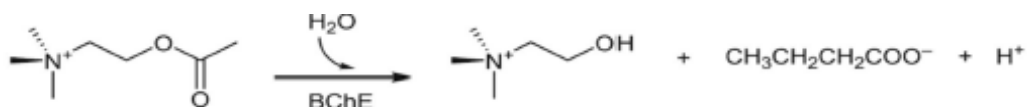
Για τον προσδιορισμό της μορφής της αναστολής που προκαλεί ένα φυτοφάρμακο στο ένζυμο (αναστρέψιμη ή μη), η διαδικασία που πρέπει να λάβει χώρα παρουσιάζεται στην Εικόνα 25. Αν το ένζυμο αποκαθιστά την αρχική ενζυμική δραστηριότητα μετά την ηλεκτροχημική μέτρηση, τότε η αναστολή είναι αναστρέψιμη. Αντίθετα, αν το ένζυμο δεν αποκαθιστά την αρχική ενζυμική δραστηριότητα, τότε η αναστολή είναι μη αναστρέψιμη.



Εικόνα 25: α) Τυπική απόκριση πριν και μετά την αναστολή στην περίπτωση που ο βιοαισθητήρας βασίζεται σε αναστρέψιμη αναστολή και β) σε περίπτωση της μη αναστρέψιμης αναστολής (56)

2.4.2 Βουτυρυλοχολινεστεράση (BuChE)

Ένα άλλο ένζυμο που σχετίζεται με την AChE είναι η βουτυρυλοχολινεστεράση (BuChE) η οποία ονομάζεται επίσης και ψευδοχολινεστεράση. Η χημική αντίδραση που καταλύει φαίνεται παρακάτω.



Εικόνα 26: Αντίδραση που καταλύεται από τη BuChE

Και τα δύο αυτά ένζυμα έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση παρασιτοκτόνων στο περιβάλλον, αλλά χρησιμοποιούν διαφορετικά υποστρώματα. Σύμφωνα με έρευνες, οι AChE και BuChE διαφέρουν επίσης στο ότι η AChE αναστέλλεται από την υπερβολική συγκέντρωση υποστρώματος, ενώ η BuChE όχι. Στον παρακάτω πίνακα φαίνεται η σύγκριση των ορίων ανίχνευσης για διάφορα φυτοφάρμακα χρησιμοποιώντας AChE ή BuChE.

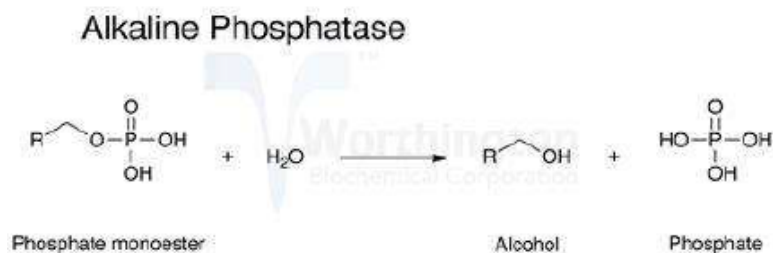
Insecticide	AChE (electric eel)	BuChE (horse serum)
Carbaryl	19 $\mu\text{g L}^{-1}$	250 $\mu\text{g L}^{-1}$
Heptenophos	1800	8.4
Malathion	500	300
Paraoxon	12	1.5
Paraoxon methyl	25	250
Trichlorfon	24	240

Πίνακας 2: Σύγκριση των ενζύμων AChE και BuChE ως προς το όριο ανίχνευσης(39)

Ο αρωματικός δακτύλιος των ενζύμων αποτελείται από αρωματικά αμινοξέα. Η BuChE έχει 8 έναντι της AChE που έχει 14. Το ενεργό μέρος και στα δύο ένζυμα φαίνεται να είναι σχεδόν ίδιο.

2.4.3 Αλκαλική φωσφατάση (ALP)

Η αλκαλική φωσφατάση καταλύει τη μεταφορά μιας φωσφορικής ομάδας στο νερό (υδρόλυση) ή μιας αλκοολικής (διαφωσφορυλίωση). Η βασική αντίδραση φαίνεται στην παρακάτω εικόνα.

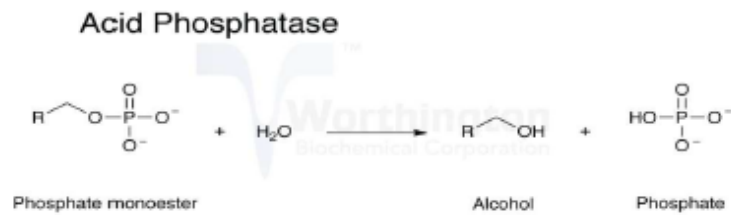


Εικόνα 27: Δράση της ALP

Το ένζυμο είναι ένα διμερές μεταλλο-ένζυμο με δύο ιόντα Zn και ένα συντονισμένο ιόν Mg²⁺ εντός της δραστικής θέσης κάθε μονομερούς. Η δραστηριότητα του ενζύμου μπορεί να ανασταλεί από το αιθυλενοδιαμινο-τετραοξικό οξύ (EDTA). Η ALP δεν έχει χρησιμοποιηθεί τόσο εκτενώς όσο η AChE για την ανίχνευση φυτοφαρμάκων στο περιβάλλον. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η έρευνα βασίστηκε στη χρήση του ενζύμου εντός ενός βιοαισθητήρα και στη χρήση διαφορετικών στρατηγικών ακινητοποίησης. Δεν έχει διαπιστωθεί κατά πόσον η ALP μπορεί να ο είναι κατάλληλος τύπος ενζύμου για την ενζυματική ανίχνευση φυτοφαρμάκων στο περιβάλλον. Δεν έχει πραγματοποιηθεί καμία έρευνα για να διερευνηθεί η ικανότητα αυτής της ενζυμικής ανάλυσης να ανιχνεύσει εντομοκτόνα σε πραγματικά δείγματα. Παρόλα αυτά, η ALP έχει επίσης χρησιμοποιηθεί σε έρευνες για την ανίχνευση των μετάλλων στο περιβάλλον με αμφίσημα αποτελέσματα. (15)

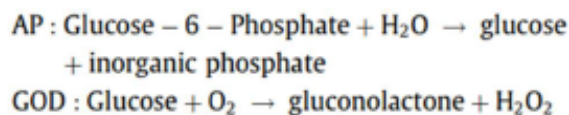
2.4.4 Οξική φωσφατάση (AP)

Η οξική φωσφατάση είναι ένζυμο που λειτουργεί βέλτιστα σε χαμηλό pH που καταλύει την εξής αντίδραση:



Εικόνα 28: Δράση οξικής φωσφατάσης

Αυτό το ένζυμο έχει χρησιμοποιηθεί σε περιορισμένη έκταση για την ανίχνευση παρασιτοκτόνων. Η AP έχει χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό και με άλλο ένα ένζυμο, την οξειδάση γλυκόζης (GOD) σε έναν βιοαισθητήρα δύο ενζύμων που χρησιμοποιεί τις ακόλουθες αντιδράσεις:

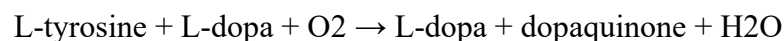


Ο βιοαισθητήρας που χρησιμοποιεί αυτά τα δυο ένζυμα, εξετάστηκε για την ανίχνευση των εξής οργανοφωσφορικών παρασιτοκτόνων (15):

- Malathion (1.5 µg/L)
- Methyl parathion (0.5 µg/L)
- Paraoxon (1.5 µg/L)

2.4.5 Τυροσινάση

Η τυροσινάση είναι ένας τύπος κατεχολικής οξειδάσης και περιέχει ένα πυρηνικό κέντρο χαλκού. Καταλύει την εξής αντίδραση:



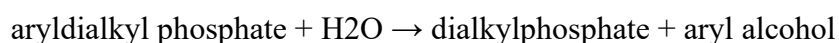
Έχει δύο θέσεις πρόσδεσης, τη θέση πρόσδεσης υποστρώματος η οποία έχει μια χημική προτίμηση για τις αρωματικές ενώσεις και την θέση οξυγόνου που έχει χημική προτίμηση για παράγοντες που προσδένονται στο μέταλλο. Το ένζυμο καταλύει την

υδροξυλίωση των μονοφαινολών σε ο-φαινόλες και την οξείδωση των ο-φαινολών σε ο-κινόνες. Η τυροσινάση αναστέλλεται από πολλές διαφορετικές ενώσεις όπως καρβαμικά και διθειοκαρβαμικά παρασιτοκτόνα, ατραζίνες, χλωροφαινόλες και θειουρίες και αυτό το χαρακτηριστικό έχει χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη βιοαισθητήρων για την ενζυματική ανίχνευση πολλών φυτοφαρμάκων.

Έρευνες έχουν δείξει πως οι βιοαισθητήρες τυροσίνης παρουσιάζουν φτωχή εξειδίκευση καθώς πολλά υποστρώματα και αναστολές παρεμβαίνουν στην ικανότητα του ενζύμου να ανιχνεύει τις στοχευόμενες ενώσεις. Το ένζυμο είναι εγγενώς ασταθές, μειώνοντας τη διάρκεια ζωής και τη χρησιμότητα του βιοαισθητήρα με βάση την τυροσινάση. Παρ' όλα αυτά έχει σημειωθεί πως οι ανιχνευτές τυροσινάσης έχουν κάποια πλεονεκτήματα έναντι άλλων τύπων ενζύμων. Η τυροσινάση έχει ανοχή για υψηλές θερμοκρασίες η οποία διευκολύνει την κατασκευή αισθητήρα και την ανίχνευση υποστρώματος. Η τυροσινάση έχει υψηλότερη ανοχή στους οργανικούς διαλύτες και έχουν κατασκευαστεί βιοαισθητήρες που λειτουργούν με οργανική φάση. Ένας βιοαισθητήρας τυροσινάσης μπορεί επίσης να λειτουργήσει γρηγορότερα από, έναν αισθητήρα AChE καθώς δεν απαιτείται προ-επώαση.

2.4.6 Οργανοφωσφορική υδρολάση (OPH)

Η οργανοφωσφορική υδρολάση είναι ένα ένζυμο που υδρολύει οργανοφωσφορικές ενώσεις όπως τα οργανοφωσφορικά παρασιτοκτόνα και παράγοντες χημικού πολέμου. Η βασική αντίδραση που καταλύει η OPH είναι η εξής:



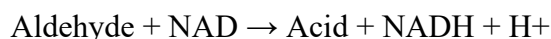
Το ένζυμο είναι ικανό να υδρολύει P-O, P-S, P- και P-CN δεσμούς που έχουν ως αποτέλεσμα την αλλαγή του pH που μπορεί να ανιχνευθεί. Τα προϊόντα της υδρόλυσης μπορούν να παρακολουθούνται φασματοφωτομετρικά ή ηλεκτροχημικά και έτσι η αναλυόμενη ουσία μπορεί να προσδιοριστεί άμεσα καθώς ο ρυθμός σχηματισμού του προϊόντος είναι ευθέως ανάλογος προς τη συγκέντρωση του αναλύτη.

Αυτή η μέθοδος είναι το αντίθετο της ενζυμικής ανίχνευσης που βασίζεται στην αναστολή όπως διεξάγεται με τις AChE και ALP. Ως εκ τούτου, έχει ορισμένα

πλεονεκτήματα έναντι των μεθόδων που βασίζονται στην αναστολή. Οι μέθοδοι με την OPH δεν απαιτούν συνεχή παροχή αναλώσιμου ενζύμου-υποστρώματος καθώς ο ίδιος ο αναλύτης είναι το υπόστρωμα. Ένα ένζυμο όπως η AChE αναστέλλεται τόσο από τα οργανοφωσφορικά όσο και από τα καρβαμικά παρασιτοκτόνα και αυτό την καθιστά λιγότερο επιλεκτική από την OPH, η οποία θα ανιχνεύει μόνο οργανοφωσφορικά. (15)

2.4.7 Αφυδρογονάση αλδεϋδης (ADH)

Η αφυδρογονάση αλδεϋδης καταλύει την οξείδωση διαφόρων αλδεϋδών χρησιμοποιώντας διουκλεοτίδιο β-νικοτιναμιδίου αδενίνης (NAD⁺) ως έναν συμπαράγοντα. Το ένζυμο αναστέλλεται απόδιθειοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα και γι' αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευσή φυτοφαρμάκων στο περιβάλλον, που ανήκουν όμως μόνο σ αυτή την οικογένεια ουσιών και όχι στα OPs. Η βασική αντίδραση που λαμβάνει χώρα είναι η εξής:



2.5 Ενζυμικοί βιοαισθητήρες

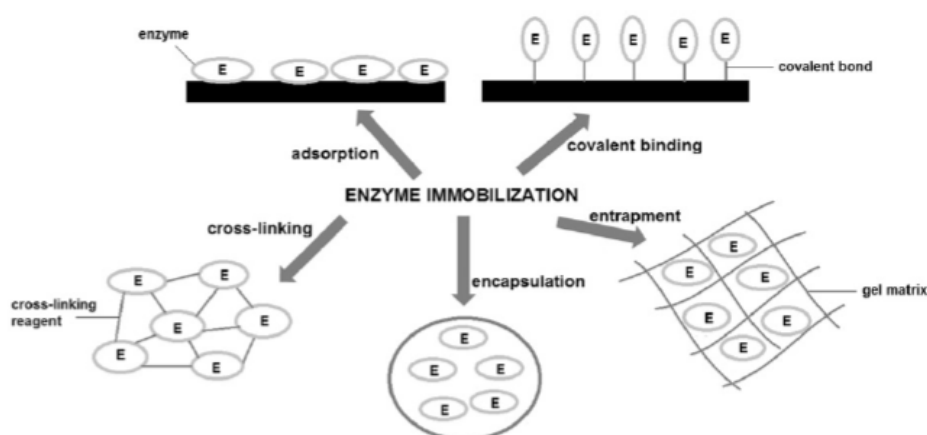
Ο μηχανισμός δράσης πολλών φυτοφαρμάκων είναι σχεδιασμένος να επηρεάζει ένα συγκεκριμένο ένζυμο που βρίσκεται μέσα στον οργανισμό-στόχο ή ακόμη και ένα ακούσιο ένζυμο. Τα οργανοφωσφορικά και καρβαμικά παρασιτοκτόνα έχουν σχεδιαστεί για να αναστέλλουν την ακετυλοχολινεστεράση και αυτό το ένζυμο έχει χρησιμοποιηθεί περισσότερο στην ενζυματική ανίχνευση αυτών των φυτοφαρμάκων. Πολλά ένζυμα που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση παρασιτοκτόνων αναστέλλονται από το παρασιτοκτόνο και η έκταση της αναστολής σχετίζεται με τη συγκέντρωση του αναλύτη.

Άλλες ενζυματικές μέθοδοι όπως η ανάλυση οργανοφωσφορικής υδρολάσης χρησιμοποιούν την αναλυόμενη ουσία ως υπόστρωμα, με αποτέλεσμα να παράγεται ένα θετικό σήμα μέσω της παραγωγής προϊόντων υδρόλυσης αντί της απλής αναστολής του ενζύμου. Κατά την επιλογή μιας συγκεκριμένης μεθόδου βασισμένης σε ένζυμο, η εμπορική διαθεσιμότητα του ενζύμου και η σταθερότητα κατά την αποθήκευση και την εφαρμογή του είναι σημαντικές εκτιμήσεις.

Στην περίπτωση ενός ενζυμικού βιοαισθητήρα, στον οποίο το ένζυμο είναι το βιοσυστατικό, η μέτρηση των αναλυόμενων ουσιών μπορεί να πραγματοποιηθεί με δυο διαφορετικές προσεγγίσεις. Στην περίπτωση που το ένζυμο μεταβολίζει την αναλυόμενη ουσία, ο αναλύτης μπορεί να προσδιοριστεί με μέτρηση του ενζυμικού προϊόντος. Ενώ στην περίπτωση που ο αναλύτης αναστέλει το ένζυμο, η μείωση του ενζυμικού προϊόντος μπορεί να μετρηθεί και να συσχετιστεί με τη συγκέντρωση του αναλύτη. Στην τελευταία περίπτωση, αυτός ο τύπος βιοαισθητήρα ονομάζεται βιοαισθητήρας βασισμένος στην αναστολή ενζύμου. (56)

2.5.1 Τρόποι ακινητοποίησης ενζύμων σε ένα βιοαισθητήρα

Η σταθερή προσκόλληση του ενζύμου στην επιφάνεια του μορφοτροπέα είναι το πιο σημαντικό βήμα στην κατασκευή του βιοαισθητήρα και προκάλεσε την επίλυση διαφόρων προβλημάτων, όπως η απώλεια ενζύμου, η διατήρηση της σταθερότητας ενζύμων και η διάρκεια ζωής του βιοαισθητήρα. Η ακινητοποίηση του ενζύμου μπορεί να παρέχει τη μείωση του χρόνου της ενζυματικής απόκρισης και προσφέρει συσκευές μίας χρήσης που μπορούν εύκολα να χρησιμοποιηθούν σε στάσιμα ή σε συστήματα ροής. Κάθε τεχνική ακινητοποίησης έχει ορισμένα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Η επιλογή της πιο εφαρμόσιμης τεχνικής εξαρτάται από τη φύση του ενζύμου, τον μορφοτροπέα και τον τρόπο ανίχνευσης. Οι συχνότερα χρησιμοποιούμενες τεχνικές ακινητοποίησης περιλαμβάνουν προσρόφηση, φυσική παγίδευση, μικροενθυλάκωση, ομοιοπολική σύνδεση και σταυροσύνδεση και απεικονίζονται στην Εικόνα 39 και αναλύονται παρακάτω.



Εικόνα 29: Τρόποι ακινητοποίησης ενζύμων στην επιφάνεια βιοαισθητήρων(42)

- Προσρόφηση (adsorption)

Η φυσική προσρόφηση είναι μία από τις απλές προσεγγίσεις για την ακινητοποίηση του ενζύμου στην επιφάνεια του αισθητήρα. Αποτελείται από απλή εναπόθεση του ενζύμου στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας και προσάρτησή του, μέσω ασθενών δεσμών όπως οι δυνάμεις van der Waals και ηλεκτροστατικές ή υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ του ενζύμου και του μορφοτροπέα. Το ένζυμο διαλύεται σε διάλυμα, κατά συνέπεια εφαρμόζεται πάνω στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας και σταθεροποιείται για κάποιο χρονικό διάστημα. Η περίσσεια του ενζύμου στη συνέχεια απομακρύνεται με έκπλυση με ρυθμιστικό διάλυμα.

Αυτή η μέθοδος ακινητοποίησης δεν συνεπάγεται οποιαδήποτε λειτουργία του υλικού ηλεκτροδίου. Ωστόσο, αυτή η τεχνική πάσχει από την εκρόφηση του ενζύμου (που προκύπτει από αλλαγές στη θερμοκρασία, το pH, την ιοντική ισχύ) και τη μη ειδική προσρόφηση. (42)

- Παγίδευση (entrapment)

Έχουν επίσης περιγραφεί μέθοδοι φυσικής παγίδευσης όπως σε μήτρες κολλοειδούς πήγματος (sol-gel) και πλέγμα πολυμερούς μήτρας ή μεμβράνης. Αυτός ο τύπος ακινητοποίησης παρουσιάζει εύκολη τεχνική ως προς την εκτέλεση και επιτρέπει μια απλή κατασκευή του ηλεκτροδίου, στο οποίο ένζυμο, μεσολαβητές και πρόσθετα μπορούν να τοποθετηθούν ταυτόχρονα στο ίδιο στρώμα.

Σε σύγκριση με άλλες τεχνικές ακινητοποίησης, επιτρέπει την αγκύρωση μιας μεγάλης ποσότητας ενζύμου, τη θερμική και χημική σταθερότητα και τη δυνατότητα επιλογής του μεγέθους και του σχήματος των πόρων για τη διείσδυση ενός υποστρώματος ή αναστολέα. Δεν υπάρχει τροποποίηση του στοιχείου βιοαναγνώρισης έτσι ώστε η δραστηριότητα του ενζύμου να διατηρείται κατά τη διάρκεια της διαδικασίας ακινητοποίησης. Επιπλέον, διάφοροι τύποι ενζύμου θα μπορούσαν να ακινητοποιηθούν μέσα στο ίδιο πολυμερές.

Οι βιοαισθητήρες στους οποίους τα ένζυμα είναι παγιδευμένα φυσικά χαρακτηρίζονται συχνά από αυξημένη λειτουργική και αποθηκευτική σταθερότητα. Τα κύρια μειονεκτήματα είναι η διαρροή ενζύμου και οι υψηλές συγκεντρώσεις μονομερούς και ενζύμου που απαιτούνται για τον ηλεκτροπολυμερισμό. Έχουν δημοσιευθεί αρκετές εργασίες που περιγράφουν το σχεδιασμό βιοαισθητήρων με βάση χολινεστεράσες

εγκλωβισμένες μέσα σε ένα πολυμερές. Οι περισσότεροι από αυτούς τους βιοαισθητήρες βασίζονται στην αμπερομετρική ανίχνευση. (43)

- Ομοιοπολική δέσμευση (covalent binding)

Η ομοιοπολική σύνδεση του ενζύμου με την πολυμερική μήτρα είναι μια πολύ δημοφιλής και η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος χημικής ακινητοποίησης για την ανάπτυξη ενζυματικών βιοαισθητήρων. Τα ένζυμα δεσμεύονται στην επιφάνεια μέσω λειτουργικών ομάδων που περιέχουν, ενώ αυτές οι ομάδες δεν είναι απαραίτητες για την καταλυτική τους δραστηριότητα. Η ομοιοπολική ακινητοποίηση διεξάγεται σε τρία στάδια:

- 1) ενεργοποίηση της επιφάνειας χρησιμοποιώντας διλειτουργικά αντιδραστήρια (π.χ. γλουταραλδεΰδη),
- 2) σύζευξη ενζύμου με το ενεργοποιημένο υποστρώμα και
- 3) απομάκρυνση των πλεοναζόντων και μη συνδεδεμένων μορίων ενζύμου.

Τα διδραστικά αντιδραστήρια συνδέονται στην πλευρά υποστήριξης με τις ενεργοποιημένες ομάδες αμίνης, καρβοξυλίου ή υδροξυλίου και στο άλλο άκρο με το ένζυμο. Αυτή η τεχνική ακινητοποίησης μπορεί να αυξήσει τη σταθερότητα του ενζύμου αλλά από την άλλη πλευρά είναι απαραίτητη μια σχετικά μεγαλύτερη ποσότητα ενζύμου και ο βιοαισθητήρας παρουσιάζει μικρότερη αναπαραγωγισιμότητα. Η ομοιοπολική σύζευξη συσχετίζεται στενά με τους σταυροδεσμούς επειδή συνήθως και οι δύο αυτές τεχνικές εμπλέκονται στη διαδικασία ακινητοποίησης.

- Σταυροδεσμοί (cross-linking)

Η ακινητοποίηση του ενζύμου με σταυροδεσμούς με γλουταραλδεΰδη ή άλλο διλειτουργικό παράγοντα (π.χ. καρβοδιμίδιο, αμινοπροπυλτριοξυσιλάνιο, εξαμεθυλενοδιαμίνη) είναι μία από τις συχνά χρησιμοποιούμενες μεθόδους για ακινητοποίηση ενζύμων. Η σταυροσύνδεση με γλουταραλδεΰδη είναι ελκυστική μέθοδος ακινητοποίησης λόγω της απλότητας της. Επιπλέον, αυτή η τεχνική θα μπορούσε να αυξήσει την προσκόλληση του ενζύμου στον μορφοτροπέα και έτσι οι ανταλλαγές ηλεκτρονίων θα μπορούσαν να συμβούν πιο άμεσα. Είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί μόνο του το ένζυμο με γλουταραλδεΰδη ή να συνδυαστεί με BSA για να διατηρηθεί η σταθερότητα της AChE. Το κύριο μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι η πιθανότητα

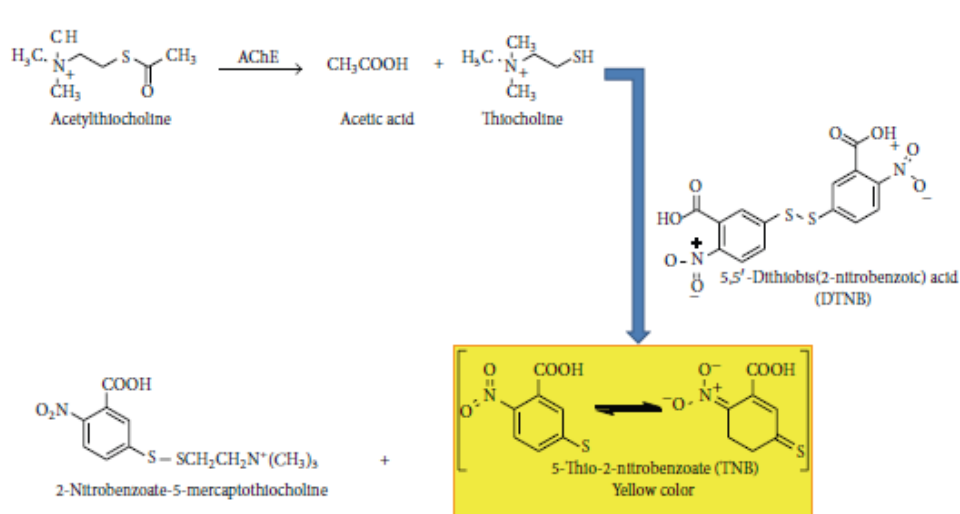
μείωσης της δραστηριότητας που προκαλείται από τη στρέβλωση της διαμόρφωσης του ενζύμου και τις χημικές μεταβολές της ενεργού θέσης κατά τη διάρκεια της διασύνδεσης. (43)

- Βιοσυγγένεια (Bio-affinity)

Οι μέθοδοι ακινητοποίησης που βασίζονται σε αλληλεπιδράσεις βιοσυγγένειας μεταξύ ενζύμων και μορίων στρεπταβιδίνης, lectins ή σάκχαρα είναι αρκετά δημοφιλείς. Η βιοτινυλίωση του ενζύμου μπορεί να επιτευχθεί μέσω ομοιοπολικής σύζευξης βιοτίνης στο ένζυμο με τη χρήση αντιδραστηρίων βιοτίνης-εστέρα που κατά προτίμηση τροποποιούν υπολείμματα λυσίνης. Αυτές οι τεχνικές επιτρέπουν την ακινητοποίηση των ενζύμων με έναν ταξινομημένο και χωρικά εξειδικευμένο τρόπο. Αυτό οδηγεί στην ανάπτυξη αποτελεσματικών βιοαισθητήρων.

2.5.2 Έλεγχος δραστηριότητας Ακετυλχολινεστεράσης (AChE) με χρωματομετρία

Για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας της AChE η πρώτη και πιο απλή μέθοδος που χρησιμοποιείται στη βιβλιογραφία είναι η χρωματομετρία (Colorimetry). Εφόσον ελεγχθεί η δραστηριότητα του ενζύμου, μπορεί κατόπιν να ακινητοποιηθεί σε ένα βιοαισθητήρα για την ανίχνευση των επιθυμητών ενώσεων. Κατά κύριο λόγο χρησιμοποιείται το αντιδραστήριο DTNB με βάση την αντίδραση Ellman όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 30: Αντίδραση Ellman και έλεγχος της δράσης του ενζύμου

Σύμφωνα με την παραπάνω αντίδραση (Εικόνα 30) μπορεί να ποσοτικοποιηθεί η αναστολή της AChE. Η AChE υδρολύει το υπόστρωμα ακετυλοθειοχολίνης (ATCh) για να παράγει τη θειοχολίνη (Thiocholine) και οξικό οξύ. Στη συνέχεια, η ελεύθερη σουλφυδρυλική ομάδα της θειοχολίνης οξειδώνει το DTNB σε 5-θειο-2-νιτροβενζοϊκό (TNB) που έχει τη μέγιστη απορρόφηση στα 412 nm και παρουσιάζει ένα κίτρινο χρώμα. Παρουσία των OPs η ένταση του χρώματος μειώνεται καθώς αναστέλεται η δράση του ενζύμου και κατά συνέπεια η παραγωγή θειοχολίνης. (47)

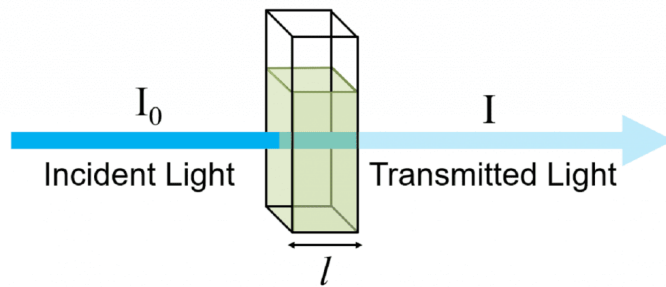
Τέλος, εκτός από τον έλεγχο της δραστηριότητας του ενζύμου παρουσία ή απουσία των φυτοφαρμάκων, η χρωματομετρία είναι εξαιρετικά χρήσιμη για τον προσδιορισμό της ύπαρξης υποστρώματος ή αντίθετα θειοχολίνης σε ένα διάλυμα με οπτικό τρόπο. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται η χημική σταθερότητα του υποστρώματος (Acetylthiocholine chloride) μόνο υπό τις προδιαγραφόμενες υποδείξεις αποθήκευσης σε μορφή σκόνης στους -20 °C. Από τη στιγμή που θα προστεθεί σε οποιοδήποτε υδατικό διάλυμα γίνεται ασταθές και υδρολύεται πάρα πολύ γρήγορα. Τα προϊόντα της υδρόλυσης είναι η θειοχολίνη και το οξικό οξύ. (Εικόνα 30)

Επομένως, με τη χρωματομετρία είναι εύκολο να διαπιστωθεί η ύπαρξη θειοχολίνης σε ένα διάλυμα ανεξάρτητα από την ύπαρξη ενζύμου. Η ένταση του χρώματος είναι ανάλογη της συγκέντρωσης θειοχολίνης στο διάλυμα, καθώς η τελευταία μπορεί να υπολογιστεί με βάση το νόμο Beer-Lambert.

$$A = \varepsilon * C * l \leftrightarrow C = \frac{A}{\varepsilon * l}$$

Εξίσωση 1: Νόμος Beer Lambert, σχέση συγκέντρωσης και απορρόφησης μιας ουσίας

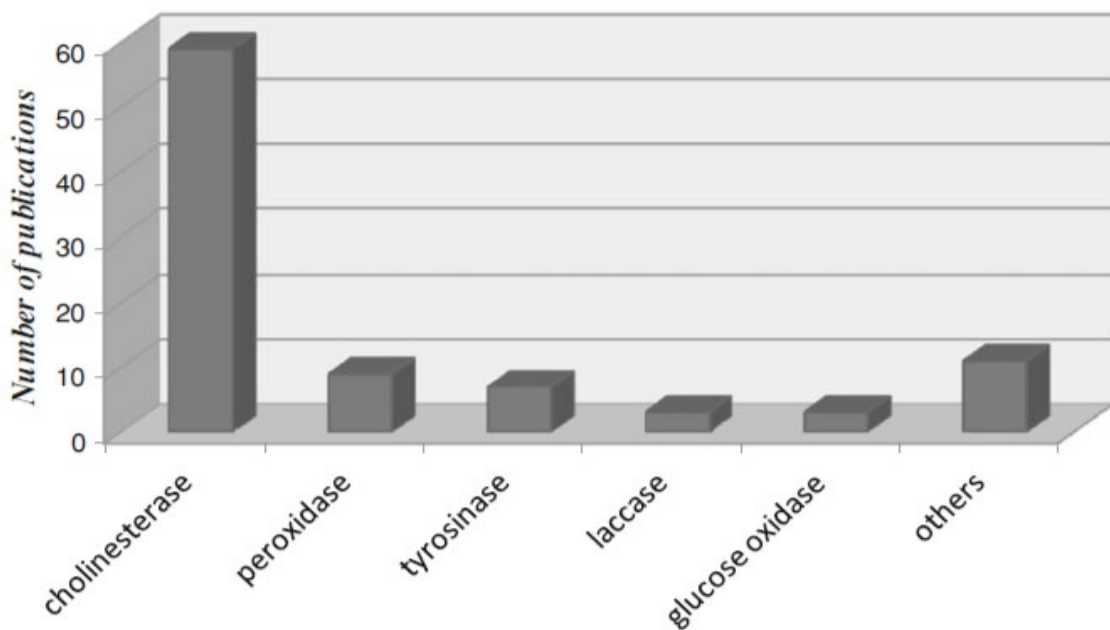
Όπου, A η τιμή της απορρόφησης και είναι αδιάστατος αριθμός, ε ο μοριακός συντελεστής απορρόφησης με διαστάσεις $M^{-1} * cm^{-1}$, C η συγκέντρωση της υπό μελέτη ουσίας με διαστάσεις M(=mol/L) και l το μήκος διαδρομής του φωτός στην κυψελίδα με διαστάσεις cm. Η τιμή του ε για το ένζυμο στους 20 °C είναι $14,15 * 10^3 M^{-1} * cm^{-1}$.



Εικόνα 31: Σχηματική παράσταση εξασθένησης της έντασης του φωτός καθώς διαπερνά την κυψελίδα

2.5.3 Βιοαισθητήρες με βάση την Ακετυλχολινεστεράση (AChE)

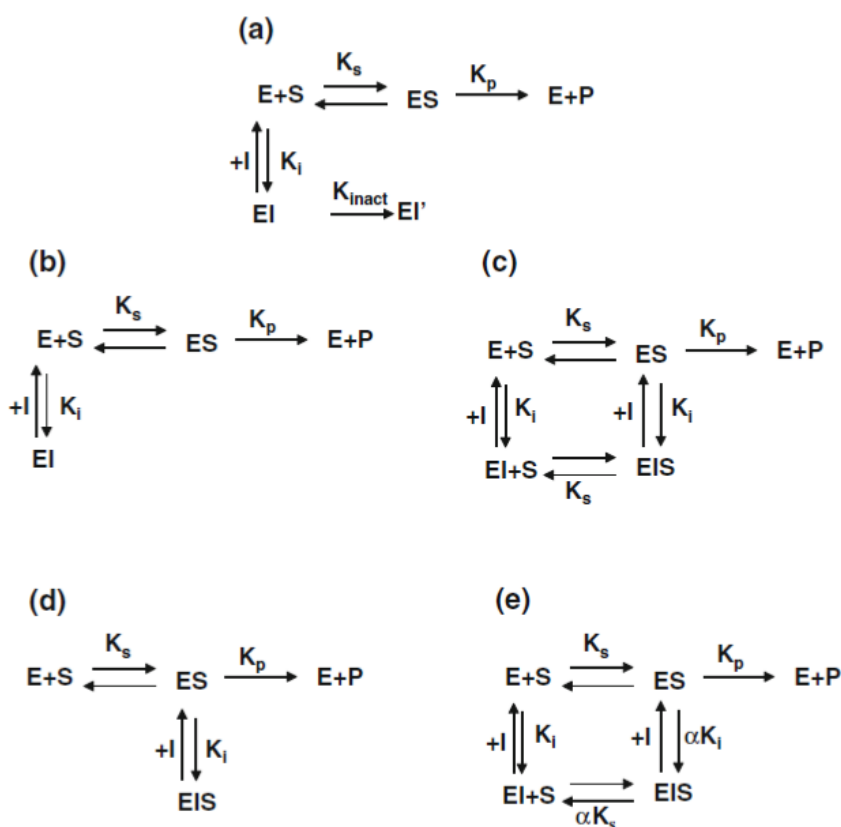
Η ακετυλχολινεστεράση (AChE), εν γένει είναι ένα από τα βιομόρια που διερευνούνται ευρέως για τον προσδιορισμό των φυτοφαρμάκων, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, όπως φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 32).



Εικόνα 32: Κατανομή των ενζύμων που χρησιμοποιούνται για την κατασκευή βιοαισθητήρων βασισμένων σε ενζυμική αναστολή (περίοδος 2006-2012) (56)

Η ανίχνευση παρασιτοκτόνων από την AChE περιλαμβάνει την αναστολή της AChE στην υδρόλυση της ακετυλοθειοχολίνης (ATCh) που λειτουργεί ως υπόστρωμα. Η συγκέντρωση των φυτοφαρμάκων μπορεί να προσδιοριστεί με ακρίβεια με την παρακολούθηση της θειοχολίνης (TCh) πριν και μετά την αναστολή. Αυτός είναι και ο κύριος λόγος για τον οποίο επιλέγεται να χρησιμοποιηθεί αυτό το ένζυμο. Στην υποενότητα 4.1.1 περιγράφεται η δράση του ενζύμου και οι μορφές αναστολής του. Στην περίπτωση αναστρέψιμης αναστολής, υπάρχουν διάφοροι μηχανισμοί που εμπλέκονται στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ ενζύμου και αναστολέα.

Οι περισσότεροι από τους αναπτυγμένους βιοαισθητήρες βασίζονται είτε σε ανταγωνιστικό είτε σε μη ανταγωνιστικό μηχανισμό. Στην πρώτη περίπτωση (Εικόνα 33 b), ο αναστολέας μπορεί να προσδεθεί στο κέντρο της ενεργού θέσης και να ανταγωνιστεί με το υπόστρωμα για την ενεργό θέση. Αυτή η ισορροπία ρυθμίζεται από τη σταθερά αναστολής που περιγράφει τη συγγένεια του αναστολέα για το ένζυμο.

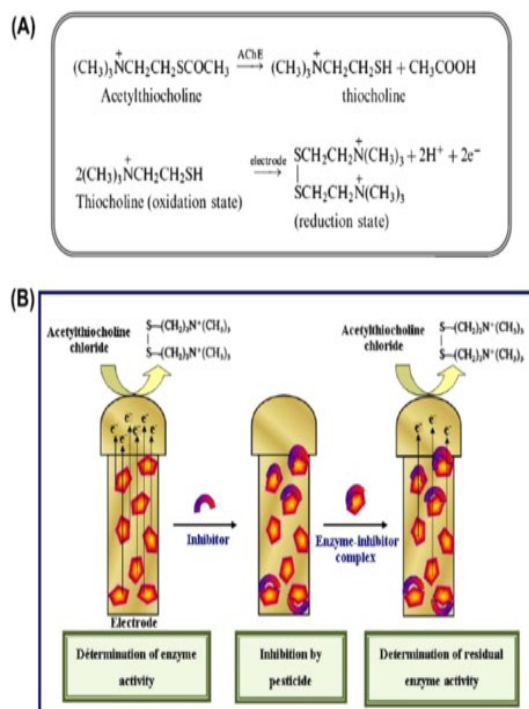


Εικόνα 33: α) Αναστολή ενζύμου στην περίπτωση μη αναστρέψιμης μορφής, b) αναστρέψιμης αναστολής ανταγωνιστικής μορφής, c) μη ανταγωνιστικής μορφής, d) uncompetitive και e) συνδυασμός μορφών αναστολής (56)

Στην ανταγωνιστική αναστολή, η υψηλή συγκέντρωση υποστρώματος ανταγωνίζεται τον αναστολέα και αποτρέπει την ανίχνευση χαμηλής συγκέντρωσης αναστολέα. Για το λόγο αυτό, προκειμένου να επιτευχθεί ένα χαμηλό όριο ανίχνευσης, η συγκέντρωση του υποστρώματος πρέπει να επιλεγεί ως συμβιβασμός μεταξύ ενός καλού αναλυτικού σήματος και ενός αποτελέσματος αναστολής που εξακολουθεί να ανιχνεύεται για το απαιτούμενο επίπεδο.

Στην περίπτωση μη ανταγωνιστικής αναστολής (Εικόνα 33c), ο αναστολέας συνδέεται τόσο με το ένζυμο όσο και με το σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος, πιθανότατα σε μια θέση διαφορετική από την ενεργή θέση, έτσι ώστε ο αναστολέας να μην ανταγωνίζεται άμεσα το υπόστρωμα. Σε αυτήν την περίπτωση, ο βαθμός αναστολής δεν εξαρτάται από τη συγκέντρωση του υποστρώματος και αυτή η μορφή επιτρέπει την επίτευξη ενός χαμηλού ορίου ανίχνευσης του αναλύτη/αναστολέα πιο εύκολα, επειδή δεν υπάρχει περιορισμός στη χρήση μιας ποσότητας υποστρώματος δίνοντας το βέλτιστο αναλυτικό σήμα. (56)

Οι ηλεκτροχημικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στους βιοαισθητήρες με βάση την AChE (A) καθώς και η στρατηγική για τη μέτρηση της ακινητοποιημένης AChE στο διάλυμα που βρίσκεται το παρασιτοκτόνο (B) φαίνονται στην Εικόνα 34. (44)(45)



Εικόνα 34: (A) ηλεκτροχημικές αντιδράσεις (B) δράση της AChE(44)

Η επί τοις εκατό αναστολή του ενζύμου στην περίπτωση που είναι αναστρέψιμη από τα φυτοφάρμακα, μπορεί να υπολογιστεί ποσοτικά μέσω της Εξίσωσης 8:

$$I\% = \frac{I_f - I_i}{I_i} \times 100$$

Εξίσωση 2: Υπολογισμός αναστολής ενζύμου

Όπου I η επί τοις εκατό αναστολή, I_i η αρχική δραστηριότητα του ενζύμου και I_f η τελική δραστηριότητα του ενζύμου μετά την αναστολή. (82)

Οι βιοαισθητήρες που βασίζονται στην αναστολή της AChE χρησιμοποιούνται συχνά για την αναγνώριση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των φυτοφαρμάκων. Αν και αυτή η μέθοδος δεν είναι επιλεκτική για διάφορα φυτοφάρμακα, μπορεί να παρέχει πληροφορίες σχετικά με τον δείκτη τοξικότητας, εκφραζόμενο ως προς το συνολικό φορτίο αντιχολινεστεράσης. Επομένως, οι βιοαισθητήρες με βάση την AChE είναι κατάλληλοι ως εργαλεία διαλογής, παρέχοντας μια γρήγορη απόκριση και σηματοδοτώντας την παρουσία των μολυσματικών ενώσεων σε δείγματα, τα οποία είναι χαρακτηριστικά ζωτικής σημασίας για τις επιτόπιες μετρήσεις. (46)

Αξίζει να αναφερθεί πως τα ένζυμα ακετυλοχολινεστεράσης από διαφορετικές πηγές μπορεί να διαφέρουν ως προς την αναστολή των παρασιτοκτόνων και την ευαισθησία τους (όριο ανίχνευσης). Διάφοροι τύποι ενζύμων AChE διατίθενται στο εμπόριο από διαφορετικές πηγές όπως το ηλεκτροφόρο χέλι (ee), τα ερυθροκύτταρα βοοειδών (be), τα ανθρώπινα ερυθροκύτταρα (he), ορός αλόγου (hs) και ανθρώπινο αίμα (hb). Μέχρι στιγμής, υπάρχουν πολλά ανασυνδυασμένα ένζυμα που αποκτήθηκαν με τη βοήθεια της γενετικής μηχανικής ανοίγοντας νέες ενδιαφέρουσες προοπτικές σε πολλές πρακτικές εφαρμογές. Έτσι, πολλά έργα με στόχο την παραγωγή μεγάλης κλίμακας γενετικά τροποποιημένων ενζύμων ακετυλοχολινεστεράσης από βακτήρια του γένους "*wild Drosophila melanogaster* (dm)" έχουν δημοσιευθεί.

Πρόσφατες έρευνες χρησιμοποίησαν ένζυμα AChE που λαμβάνονται από το παραπάνω βακτήριο, και γενετικά τροποποιημένες μορφές AChE για την κατασκευή πιο ευαίσθητων βιοαισθητήρων. Αυτή είναι μια νέα προσέγγιση για τους ηλεκτροχημικούς αισθητήρες που απαιτούν χαμηλότερα όρια ανίχνευσης με υψηλότερη επιλεκτικότητα και

ευαισθησία. Από τα μη μεταλλαγμένα ένζυμα, η AChE από ηλεκτροφόρο χέλι ήταν πιο ευαίσθητο συγκριτικά με την AChE από βοοειδή και από ανθρώπινα ερυθροκύτταρα.

Αναφορικά με τη φυσική προσρόφηση, οι Bonnet et al. ακινητοποίησαν το ένζυμο AChE στην επιφάνεια ενός SPE ηλεκτροδίου (ηλεκτρόδιο εργασίας γραφίτη και ηλεκτρόδιο αναφοράς Ag /AgCl). Αυτός ο αισθητήρας χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση των ανασταλτικών επιδράσεων των οργανοφωσφορικών και καρβαμικών εντομοκτόνων στην AChE, και ιδιαίτερα του chlorpyrifos ethyl oxon.

Οι Joshi et al. πέτυχαν την προσρόφηση της ακετυλοχολινεστεράσης και της χολινοξειδάσης επάνω στην επιφάνεια ενός SPE ηλεκτροδίου με βάση τους νανοσωλήνες άνθρακα και χρησιμοποίησαν αυτόν τον βιοαισθητήρα για ανίχνευση οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων. Οι Sotiropoulou et al., ακινητοποίησαν την AChE με προσρόφηση σε νανοδομημένο αγωγίμο άνθρακα, το οποίο ενεργεί ως ηλεκτρόδιο εργασίας. Οι Du et al. πέτυχαν την προσρόφηση της AChE πάνω σε multi-walled νανοσωλήνες άνθρακα. Οι Vorca'kova et al. ακινητοποίησαν την AChE μέσω προσρόφησης επί της επιφανείας SPE αισθητήρα τριών ηλεκτροδίων για τον προσδιορισμό της αναστολής χολινεστεράσης παρουσία ορισμένων υποκατεστημένων φαινυλοκαρβαμικών ενώσεων.(43)

Ως προς την τεχνική της παγίδευσης, οι Andreescu et al. ακινητοποίησαν την AChE σε SPE ηλεκτρόδιο σε (πολυ)βινυλ-αλκοόλη που φέρει πολυμερικές ομάδες στυρυλπυριδινίου. Χρησιμοποίησαν οξικό ρ-αμινοφαινύλιο ως υπόστρωμα της AChE και η οξειδωσή του ως προϊόν παρακολουθήθηκε στα 100mV έναντι του ηλεκτροδίου αναφοράς Ag/AgCl. Αυτός ο βιοαισθητήρας χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση παρασιτοκτόνων σε οργανικούς διαλύτες αναμίξιμους με νερό. Οι Yang et al. Ανέπτυξαν έναν μικροβιοαισθητήρα για την ακετυλοχολίνη και τη χολίνη με βάση τη σύνθετη μεμβράνη από ηλεκτρο-πολυμερισμό /κολλοειδές πήγμα. Η BSA και η χολινοξειδάση (ChOx) συν-ακινητοποιήθηκαν σε μεμβράνη sol-gel οξειδίου ψευδαργύρου στο τροποποιημένο ηλεκτρόδιο Pt για έναν πολυενζυμικό αισθητήρα. Η BSA στο κολλοειδές πήγμα μπορεί να παρέχει καλύτερη σταθερότητα και δραστικότητα των ενζύμων.

Οι Bucur et al. σχεδίασαν έναν βιοαισθητήρα για την εξαιρετικά ευαίσθητη ανίχνευση καρβαμικών εντομοκτόνων με βάση την ακινητοποίηση AChE μέσω παγίδευσης σε ένα βελτιστοποιημένο πλέγμα sol-gel σε τετρακυανοκινοδιμεθάνιο-τροποποιημένα SPE ηλεκτρόδια με πάστα γραφίτη. Οι Du et al., χρησιμοποίησαν την ακινητοποιημένη AChE σε μεμβράνη κολλοειδούς πήγματος διοξειδίου του πυριτίου που συνδύαζε νανοσωματίδια

χρυσού. Οι Valde's-Rami'rez et al. ακινητοποίησαν τρεις διαφορετικές AChEs σε ηλεκτρόδια τροποποιημένα με κοβάλτιο και φθαλοκυανίνη με παγίδευση σε φωτοδιασταυρούμενο πολυμερές (φωτοπολυμερές με υδατοδιαλυτό υπόστρωμα). Πολύ παρόμοια διαμόρφωση δηλαδή χρήση της ίδιας τροποποίησης ηλεκτροδίων και τεχνικής ακινητοποίησης ενζύμου, χρησιμοποιήθηκε από τους Mishra et al. Σχεδίασαν έναν αυτόματο βιοαισθητήρα με ροή και χρησιμοποίησαν τρεις γενετικά τροποποιημένες AChE. Αυτός ο βιοαισθητήρας, χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του ethyl paraoxon, του chlorpyrifos-oxon και του malaoxon στο γάλα.

Οι Raghu et al. ανέφεραν την κατασκευή ενός απλού βολταμετρικού μονοενζυματικού βιοαισθητήρα για τον άμεσο, ευαίσθητο και επιλεκτικό προσδιορισμό του methyl parathion με τη χρήση ακινητοποιημένης AChE σε sol-gel επί της επιφανείας Carbon Paste ηλεκτροδίου.

Ως προς την ακινητοποίηση ενζύμων με σταυροδεσμούς, οι Pohanka et al. σχεδίασαν έναν ηλεκτροχημικό βιοαισθητήρα με την AChE ακινητοποιημένη με γλουταραλδεΐδη παρουσία της BSA σε αισθητήρα SPE τριών ηλεκτροδίων για την ανίχνευση νευρικών παραγόντων. (43)

Επίσης, η ακινητοποίηση του ενζύμου έχει επιτευχθεί με τη χρήση δυο οργανικών πολυμερικών υλικών, της ζελατίνης και της χιτοζάνης.

❖ Ζελατίνη (Gelatin)

Η ζελατίνη αντιπροσωπεύει αναγωγικό και σταθεροποιητικό αντιδραστήριο και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε πολλές περιοχές ακινητοποίησης ενζύμων. Η χρήση ζελατίνης στην ακινητοποίηση της AChE περιγράφηκε από τους Timur και Telefoncu, όταν παρασκευάστηκε το μίγμα AChE και ζελατίνης και εναποτέθηκε στην ευαίσθητη περιοχή του pH ηλεκτροδίου με τη μέθοδο deep coating. Οι Pohanka et al. χρησιμοποίησαν τη ζελατίνη σε συνδυασμό με γλουταραλδεΐδη, κατασκευάζοντας έναν χρονοαμπερομετρικό βιοαισθητήρα που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της ανασταλτικής δράσης των νευρικών παραγόντων.

❖ Χιτοζάνη (Chitosan)

Η χιτοζάνη είναι ένα βιολογικό κατιονικό μακρομόριο με πρωτοταγείς αμίνες. Η χιτοζάνη παρέχει βιοσυμβατό χαρακτήρα στο ένζυμο. Λόγω των πολλών ιδιοτήτων (π.χ. εξαιρετική ικανότητα σχηματισμού φιλμ, υψηλή διαπερατότητα προς το νερό, βιοσυμβατότητα, μη τοξικότητα, εύκολος χειρισμός, υψηλή μηχανική αντοχή), η χιτοζάνη

είναι προτιμητέα γιατί προσφέρει διατήρηση της υψηλής βιολογικής δράσης των βιομορίων και για την ενίσχυση της ευαισθησίας του αισθητήρα. Λόγω των δελεαστικών ιδιοτήτων της, η χιτοζάνη έχει λάβει μεγάλο ενδιαφέρον ως υλικό για το σχεδιασμό τροποποιημένων ηλεκτροδίων και η γλουταραλδεΰδη χρησιμοποιήθηκε ευρέως ως διασυνδετικός παράγοντας.

Οι Sun et al. περιέγραψαν την τεχνική όπου η μεμβράνη χιτοζάνης χρησιμοποιήθηκε για την ακινητοποίηση της AChE μέσω σταυροδεσμών με γλουταραλδεΰδη για την επιλεκτική ανίχνευση παρασιτοκτόνων. Multi-walled νανοσωλήνες άνθρακα, νανοσωματίδια χρυσού και Prussian Blue χρησιμοποιήθηκαν για την τροποποίηση ηλεκτροδίων εργασίας άνθρακα. Οι Du et al. σχεδίασαν μια απλή τεχνική για την ακινητοποίηση της AChE όπου η γλουταραλδεΰδη χρησιμοποιήθηκε ως cross-linker για την ομοιοπολική σύνδεση του AChE με multi-walled νανοσωλήνες άνθρακα με χιτοζάνη.

Οι Chauhan και Pundir δημιούργησαν έναν αμπερομετρικό βιοαισθητήρα με την ταυτόχρονη ακινητοποίηση των AChE και ChOx πάνω στη νανοσυντιθέμενη χιτοζάνη ενισχυμένη με νανοσωματίδια χρυσού επικαλυμμένα με οξείδιο του σιδήρου που ηλεκτροδοτούνται πάνω στην επιφάνεια του χρυσού ηλεκτροδίου. Οι Chen et al. ανέπτυξαν έναν ευαίσθητο αμπερομετρικό βιοαισθητήρα με AChE, βασισμένο σε multi-walled νανοσωλήνες άνθρακα, νανοσωματίδια οξειδίου του κασσιτέρου και χιτοζάνη. Αυτός ο βιοαισθητήρας χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση καταλοίπων φυτοφαρμάκων. (43)

Επιπλέον, με τη βοήθεια της βιοσυγγένειας, οι Yao et al. χρησιμοποίησαν βιοτινυλιωμένα ένζυμα (AChE, ChOx) για την ανάπτυξη βιοαισθητήρων χημειοφωταύγειας για την ανίχνευση ακετυλοχολίνης και χολίνης σε βιολογικά υγρά. Πρώτα η στρεπταβιδίνη παγιδεύτηκε σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου χρησιμοποιώντας μια μικρή ποσότητα γλουταραλδεΰδης. Στη συνέχεια, η παρασκευασμένη μεμβράνη επώαστηκε παρουσία βιοτινυλιωμένων ChOx και AChE. Οι Gao et al. χρησιμοποίησαν στρεπταβιδίνη-βιοτίνη για την ακινητοποίηση AChE πάνω σε νανοσωλήνες άνθρακα. Για την ακινητοποίηση του ενζύμου, είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί πρόσδεση βιοσυγγένειας με χρήση κονκαναβαλίνης A.

Οι Bucur et al. ανέφεραν μια νέα μέθοδο ακινητοποίησης AChE με βάση την αλληλεπίδραση υψηλής συγγένειας μεταξύ του ενζύμου και της κονκαναβαλίνης A για τον αμπερομετρικό SP βιοαισθητήρα AChE. Ένα χρόνο αργότερα, η ίδια ομάδα παρουσίασε μια άλλη εργασία σχετικά με τη δυνατότητα χρήσης κονκαναβαλίνης A για την

ακίνητοποίηση της AChE και την προετοιμασία του βιοαισθητήρα. Σε αυτή την εργασία, η επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας τροποποιήθηκε με ένα στρώμα Nafion που περιέχει γραφίτη, 7,7,8,8-τετρακυανοκινοδιμεθάνιο ως μεσολαβητή και επτυλαμίνη. Οι Ivanov et al. Περιέγραψαν την ακίνητοποίηση της AChE μέσω κονκαναβαλίνης A μαζί με γλουταραλδεΐδη. Χρησιμοποίησαν αυτόν τον βιοαισθητήρα για την ανίχνευση οργανοφωσφορικών παρασιτοκτόνων.

Κάθε μέθοδος ακίνητοποίησης έχει ορισμένα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Επομένως, μερικές φορές είναι πολύ χρήσιμο να συνδυάζονται διάφορες μέθοδοι ακίνητοποίησης. Για παράδειγμα, οι Dutta et al. ανέφεραν την τεχνική ακίνητοποίησης που βασίζεται στην ηλεκτροπαγίδευση της AChE σε πολυπυρρόλη παρουσία χαμηλής ποσότητας KCl που ακολουθείται από σταυροδεσμούς με γλουταραλδεΐδη και ζελατίνη.

2.5.4 Χρήση περισσότερων του ενός ενζύμων

Στην πλειονότητα των δημοσιεύσεων έχει χρησιμοποιηθεί η AChE ως το βασικό και καταλληλότερο ένζυμο για την ανίχνευση φυτοφαρμάκων σε δείγματα π.χ. νερό και τρόφιμα. Παρ' όλα αυτά, έχουν χρησιμοποιηθεί συστήματα δύο ή παραπάνω ενζύμων με στόχο την αύξηση τόσο της ευαισθησίας όσο και της απεικόνισης των αποτελεσμάτων.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα δι-ενζυμικού συστήματος είναι η χρήση της AChE σε συνδυασμό με την χολινοξειδάση (ChOD). Η AChE υδρολύει το φυσικό υπόστρωμά της (ACh) σε χολίνη και οξικό οξύ. Δεδομένου ότι η χολίνη δεν είναι ηλεκτροχημικά δραστική, η χολινοξειδάση χρησιμοποιείται για την παραγωγή H₂O₂, το οποίο μπορεί να οξειδωθεί σε ηλεκτρόδιο λευκόχρυσου περίπου στα +0,7 V vs Ag/AgCl, όπως φαίνεται στις παρακάτω αντιδράσεις.

Ένα δεύτερο παράδειγμα δι-ενζυμικού συστήματος αποτελεί ο συνδυασμός της AChE με τυροσινάση. Στην περίπτωση αυτή, η ενζυμική υδρόλυση του οξικού φαινυλίου παράγει ενώσεις φαινόλης, που χαρακτηρίζονται από υψηλής οξειδωσης δυναμικό. Για το λόγο αυτό, η τυροσινάση χρησιμοποιήθηκε για να μετατρέψει τη φαινόλη σε κινίνη, ένωση που μπορεί να είναι ηλεκτροχημικά ανηγμένη σε κατεχόλη στα -150 mV vs Ag / AgCl.

Επιπλέον, ένα παράδειγμα τρι-ενζυμικού συστήματος αποτελεί η πρόσθεση υπεροξειδάσης σε δι-ενζυμικό σύστημα. Στη βιβλιογραφία έχει χρησιμοποιηθεί Quartz

Crystal Microbalance (QCM) αισθητήρας που βασίζεται σε τρία ένζυμα για τον προσδιορισμό των οργανοφωσφορικών και καρβαμικών ενώσεων. Η ακετυλοχολίνη μετατρέπεται σε χολίνη από την AChE και στη συνέχεια, η χολίνη μετατρέπεται σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) από την χολινοξειδάση. Υπό την παρουσία HRP, το H_2O_2 οξειδώνει την 3,3'-διαμινοβενζιδίνη σε ένα αδιάλυτο προϊόν το οποίο κατακρημνίστηκε και προσροφήθηκε πάνω στην επιφάνεια του κρυστάλλου προκαλώντας μείωση της συχνότητας συντονισμού του κρυστάλλου. Η αναστολή της AChE από τα παρασιτοκτόνα μείωσε την ποσότητα του παραγόμενου, QCM-ανιχνεύσιμου ιζήματος. Αυτό το σύστημα αισθητήρα QCM με ενζύμο επέτρεψε την ανίχνευση των συγκεντρώσεων των carbaryl και dichlorvos κάτω από 1 ppm. (48)

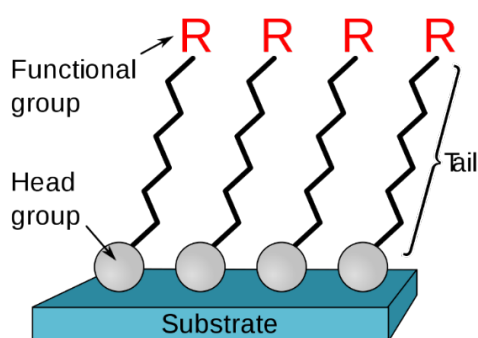
Ο J. SusanVanDyk και οι συνεργάτες του, σε μια δημοσίευση σχετικά με τη χρήση ενζύμων για την ανίχνευση παρασιτοκτόνων, παραθέτουν σε αναλυτικό πίνακα το είδος του παρασιτοκτόνου με το όριο ανίχνευσής του, το ένζυμο (ή ένζυμα) που χρησιμοποιήθηκε, τη μέθοδο μέτρησης, τον τύπο των ηλεκτροδίων και ορισμένα χαρακτηριστικά που αφορούν την κάθε μέτρηση. Συμπερασματικά, η χρήση της AChE σε συνδυασμό με διάφορους τύπους ηλεκτροδίων έδωσε αρκετά ικανοποιητικά αποτελέσματα. (39) Παρόλα αυτά, η χρήση περισσότερων ενζύμων αυξάνει την πολυπλοκότητα του βιοαισθητήρα, το κόστος του καθώς και τις συνθήκες λειτουργίας του.

2.5.5 Τροποποίηση ηλεκτροδίων για τη βελτίωση της ευαισθησίας του αισθητήρα

Τα τελευταία χρόνια, η τροποποίηση των διασυνδέσεων των ηλεκτροδίων με νέα προσδιοριζόμενα μόρια εφαρμόζεται για τον ηλεκτροχημικό προσδιορισμό των OPs, για τη βελτιωμένη ηλεκτροαναλυτική απόδοση, ευαισθησία, γρήγορη απόκριση και εύκολη πραγματική εφαρμογή. Οι ενώσεις-στόχοι όπως τα OPs προσροφώνται πάνω στη χημικώς τροποποιημένη επιφάνεια που καθιστά δυνατή την ανίχνευση μικρών συγκεντρώσεων.

Η ακινητοποίηση του ενζύμου στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου είναι εξίσου σημαντική υπόθεση με τη λήψη υψηλών σημάτων κατά την ανίχνευση των επιθυμητών ουσιών. Στη βιβλιογραφία σχετικά με την τροποποίηση ηλεκτροδίων χρυσού, έχουν μελετηθεί οι αυτοσυναρμολογούμενες μονοστιβάδες (Self Assembled Monolayers) από

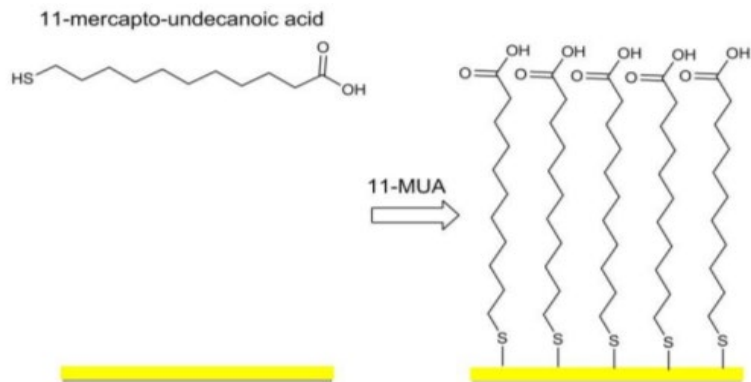
οργανικά μόρια. Είναι μοριακά συγκροτήματα που σχηματίζονται αυθόρμητα σε μια επιφάνεια με προσρόφηση και είναι οργανωμένα σε περισσότερο ή λιγότερο μεγάλες προκαθορισμένες περιοχές. Σε μερικές περιπτώσεις τα μόρια που σχηματίζουν τη μονοστιβάδα δεν αλληλεπιδρούν έντονα με το υπόστρωμα (επιφάνεια του ηλεκτροδίου), ενώ σε άλλες τα μόρια διαθέτουν μια ομάδα κεφαλών που έχει ισχυρή συγγένεια με το υπόστρωμα και στερεώνει το μόριο σε αυτό (Εικόνα 35). Οι κεφαλές αποτελούνται από ομάδες θειολών, σιλανίων κλπ. (61)



Εικόνα 35: Αναπαράσταση της δομής μιας αυτοσυναρμολογούμενης μονοστιβάδας (SAM)

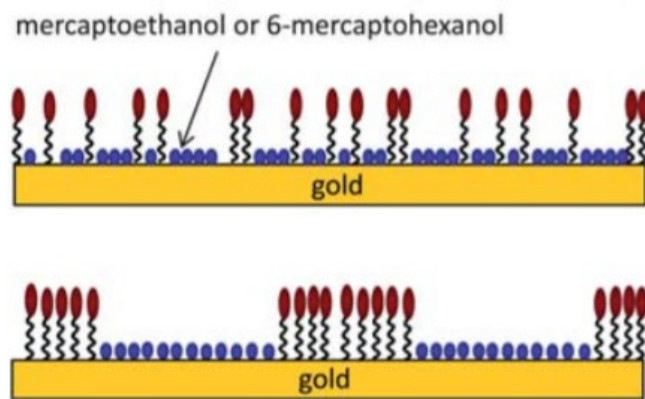
Τα SAMs δημιουργούνται από τη χημική προσρόφηση των ομάδων κεφαλής πάνω σε ένα υπόστρωμα είτε από την αέρια είτε από την υγρή φάση ακολουθούμενη από μια αργή οργάνωση των ομάδων-ουρών. Αρχικά σε μικρή μοριακή πυκνότητα στην επιφάνεια, τα προσροφημένα μόρια σχηματίζουν είτε μια διαταραγμένη μάζα μορίων είτε σχηματίζουν μια διατεταγμένη διδιάστατη φάση που με την πάροδο του χρόνου σχηματίζει τριδιάστατικές κρυσταλλικές ή ημικρυσταλλικές δομές στην επιφάνεια του υποστρώματος-ηλεκτροδίου. Οι ομάδες κεφαλής συναρμολογούνται μαζί στην επιφάνεια, ενώ οι ομάδες ουρών συναρμολογούνται μακριά από αυτή. Έτσι, η επιφάνεια του ηλεκτροδίου σιγά σιγά καλύπτεται από τη μονοστιβάδα που αποτελείται από συσσωματώματα τέτοιων μορίων. (62)

Με βάση τη βιβλιογραφία ο πιο ευρέως χρησιμοποιούμενος τύπος SAM σε επιφάνειες χρυσού είναι το μερκαπτο-ενδεκανοϊκό οξύ (11-MUA), το οποίο ως ομάδα κεφαλής έχει θειόλες και ως ομάδα ουράς έχει καρβοξύλια, όπως φαίνεται στην Εικόνα 46. (63) (64)



Εικόνα 36: Δομή και χημική προσρόφηση του μερκαπτο-ενδεκανοϊκού οξέως (11-MUA) στην επιφάνεια χρυσού (66)

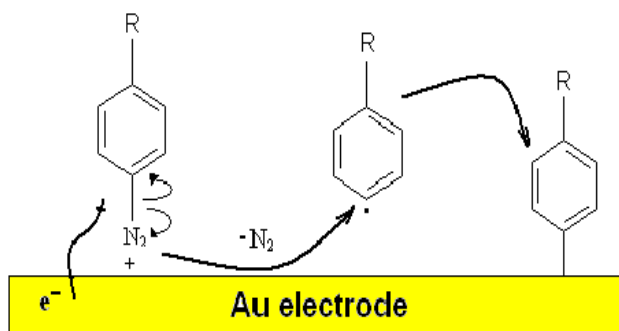
Επιπλέον, σε ορισμένες δημοσιεύσεις αναφέρεται η μίξη του μερκαπτο-ενδεκανοϊκού οξέος με μερκαπτο-εξανόλη ή μερκαπτο-αιθανόλη, δύο άλλα αυτοδιατασσόμενα οργανικά μόρια αρκετά μικρότερα στη δομή (Εικόνα 37). Η μίξη αυτή εξυπηρετεί δυνητικά την αποφυγή μεγάλων συσσωματωμάτων μερκαπτο-ενδεκανοϊκού οξέος με στόχο να φτάνουν τα ηλεκτρόνια πιο εύκολα στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου, για καλύτερη ηλεκτροχημική ανίχνευση.



Εικόνα 37: Μίξη μερκαπτο-ενδεκανοϊκού οξέος με μερκαπτο-εξανόλη πάνω στην επιφάνεια χρυσού (65)

Βιβλιογραφικά, έναν εναλλακτικό τρόπο τροποποίησης των επιφανειών χρυσού αποτελεί η χρήση διαλυμάτων διαζωνικών αλάτων (Diazonium Salt Solutions). Όσο αφορά την εφαρμογή του βιοαισθητήρα, χρησιμοποιούνται αγώγιμα πολυμερή για την τροποποίηση των επιφανειών με στόχο την ανίχνευση βιομορίων. Μεταξύ των αγώγιμων αυτών πολυμερών, οι πολυανιλίνες και τα παράγωγά τους (π.χ. το αμινοβενζοϊκό οξύ είναι καρβοξυλιωμένο μονομερές ανιλίνης) έχουν καταστεί από τα πιο ενδιαφέροντα αγώγιμα

πολυμερή, με εφαρμογή στους βιοαισθητήρες. Η τροποποίηση της επιφάνειας χρυσού μπορεί να επιτευχθεί είτε με ηλεκτροπολυμερισμό των μονομερών ουσιών ώστε να προκύψουν διαζωνικά άλατα, είτε με φυσική προσρόφηση του τελικού προϊόντος αγώγιμου πολυμερούς πάνω στην επιφάνεια. (77)



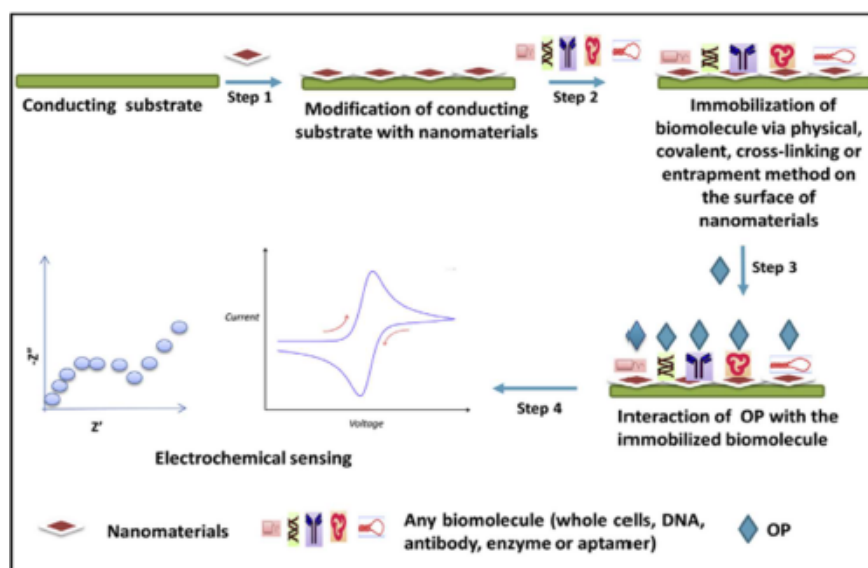
Εικόνα 38: Διάταξη Διαζωνικών αλάτων πάνω σε επιφάνεια χρυσού (67)

Εκτός από την τροποποίηση επιφανειών με οργανικά μόρια όπως τα διαζωνικά άλατα και τα SAMs, έχει μελετηθεί εκτενώς και η χρήση διαφόρων νανοϋλικών εντός απλών ή πιο περίπλοκων διατάξεων. Η παρουσία νανοϋλικών στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου αυξάνει την ηλεκτροστατική επιφάνεια και την ηλεκτρική αγωγιμότητα, ενισχύει το φορτίο του βιομορίου στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου και επιτρέπει την ταχεία κινητική μεταφοράς ηλεκτρονίων. Λόγω των φυσικών, χημικών και ηλεκτρικών ιδιοτήτων, διάφορα NPs έχουν χρησιμοποιηθεί ως κατάλληλη μήτρα για τη φόρτωση ενζύμων.

Η κατάλληλη ακινητοποίηση του ενζύμου στην επιφάνεια των νανοϋλικών δεν ενισχύει μόνο τη συγκέντρωση του μορίου βιοαναγνώρισης στην κατάλληλη θέση αλλά προστατεύει επίσης τα βιομόρια από την καταστροφή τους. (50) Οι αισθητήρες που βασίζονται στην κατάλυση με βάση τα νανοϋλικά είναι πιο σταθεροί, ευαίσθητοι και λειτουργικοί.

Διαφορετικοί τύποι νανοϋλικών βασισμένοι σε άνθρακα, μεταλλικά νανοσωματίδια (NPs), οξείδια μετάλλων, κβαντικές κουκίδες (QDs), αγώγιμα πολυμερή (CPs), φουλλερένια, δενδριμερή, screen printed ηλεκτρόδια (SPEs) έχουν διερευνηθεί για τις εφαρμογές ανίχνευσης. Ο μεγάλος λόγος εμβαδού επιφάνειας προς τον όγκο των νανοϋλικών αυξάνει έντονα τη συγγένεια δέσμευσης του ακινητοποιημένου βιομορίου μέσω των τεχνικών ακινητοποίησης. (15)

Οι συνήθεις μέθοδοι ακινητοποίησης περιλαμβάνουν τη φυσική προσρόφηση, τη μέθοδο ομοιοπολικής σύνδεσης, τη σύνδεση μέσω σταυροδεσμών (cross-linking) ή την παγίδευση του βιομορίου πάνω στην επιφάνεια του υποστρώματος. Στο παρακάτω σχήμα απεικονίζονται τα βήματα που ακολουθούνται για την κατασκευή ενός ηλεκτροχημικού βιοαισθητήρα.



Εικόνα 39: Βήματα για την κατασκευή ηλεκτροχημικού βιοαισθητήρα(15)

Είναι γνωστό ότι τα CNTs (Carbon Nanotubes) αποτελούν ιδανικά υλικά για τους βιοαισθητήρες λόγω της υψηλής αγωγιμότητας, της διαλυτότητας και της σταθερότητάς τους. Οι CNTs είναι ίνες υψηλής αντοχής. Οι ισχυροί γραφιτικοί δεσμοί C-C στο εσωτερικό, τους καθιστούν εξαιρετικά ισχυρούς και δύσκαμπτους έναντι των αξονικών στελεχών. Τόσο τα SWCNT (Single-walled) όσο και τα MWCNTs (Multi-walled) έχουν αναφερθεί ως μήτρες για την κατασκευή βιοαισθητήρων με βάση την αναστολή της ηλεκτροχημικής AChE για την ανίχνευση των οργανοφωσφορικών. Σε διάφορες μελέτες αναφέρεται ότι οι ηλεκτροστατικές θέσεις των CNT βρίσκονται στα άκρα των σωλήνων και ότι τα κατακόρυφα ευθυγραμμισμένα SWCNT διευκολύνουν τη ροή περισσότερων ηλεκτρονίων σε σύγκριση με τα τυχαία κατανεμημένα CNTs.

Παραδείγματος χάριν, η εναπόθεση layer-by-layer της AChE και PDDA στο τροποποιημένο GCE με αρνητικά φορτισμένο CNT, είχε σαν αποτέλεσμα τη σημαντική ανίχνευση 0.4 pM του παραoxon εντός χρόνου αναστολής 6 λεπτών. Η ενσωμάτωση των

CNT στην μεμβράνη PDDA γενικά ενίσχυσε τη ροή μεταφοράς ηλεκτρονίων και το όριο ανίχνευσης. (15)

Επίσης, ορισμένες ηλεκτρικές και μηχανικές ιδιότητες του γραφένιου το καθιστούν ιδανική επιλογή για μήτρα. Το γραφένιο είναι ένα μονοδιάστατο στρώμα από υβριδισμένα άτομα άνθρακα sp^2 τροχιακών που μπορούν να σχηματίσουν φουλερένια (0D), 1D CNTs και αν στοιβαχθούν 3D δομές γραφίτη. Το οξείδιο του γραφένιου (GO) που περιέχει λειτουργίες οξυγόνου, το ανηγμένο οξείδιο του γραφένιου (rGO) (αναγωγή του οξειδίου του γραφένιου με λιγότερες λειτουργίες οξυγόνου) και το λειτουργικοποιημένο γραφένιο χρησιμοποιούνται ευρέως για την ακινητοποίηση βιομορίων ή για την ανίχνευση διαφόρων αναλυτών. Η ετερογενής ταχύτητα μεταφοράς ηλεκτρονίων είναι υψηλή στο επίπεδο της άκρης του πλέγματος αντί του βασικού επιπέδου του γραφένιου. Μελετήθηκε επίσης ότι η υψηλή ποσότητα λειτουργικών ομάδων οξυγόνου στην επιφάνεια του γραφίτη μειώνει την ταχύτητα μεταφοράς ηλεκτρονίων. Εκτός από τα CNT και το γραφένιο έχει χρησιμοποιηθεί στην ανάπτυξη ηλεκτροχημικών αισθητήρων με βάση την AChE, μειώνοντας αρκετά το όριο ανίχνευσης των OPs. (51)

Ένα επιπλέον παράδειγμα τροποποίησης ηλεκτροδίων αποτελεί η δημοσίευση του Zhou et al, όπου ένας αμπερομετρικός βιοαισθητήρας με την AChE ακινητοποιημένη σε νανοσωματίδια διοξειδίου του πυριτίου σε συνδυασμό με carboxylic graphene και nafion παράχθηκε για την ανίχνευση και ανάλυση των φυτοφαρμάκων carbofuran και parathion. Οι συγγραφείς αυτής της δημοσίευσης κατάφεραν να φτάσουν σε όριο ανίχνευσης ίσο με 5×10^{-14} mol/L για το parathion και 5×10^{-13} mol/L για το carbofuran αντίστοιχα. (51)

Οι βελτιώσεις στους βιοαισθητήρες (π.χ. αμπερομετρικοί) έχουν εστιαστεί κυρίως σε δύο πτυχές. Η μία είναι η βελτίωση της ηλεκτροκαταλυτικής ικανότητας και η ενίσχυση της μεταφοράς ηλεκτρονίων μέσω της τροποποίησης του ηλεκτροδίου εργασίας σε χαμηλότερο δυναμικό. Έχει χρησιμοποιηθεί μια ποικιλία μεθόδων τροποποίησης, όπως η φθαλοκυανίνη κοβαλτίου (Cobalt Phthalocyanine), το Prussian Blue (PB) και το Carbon Black. (79)

Η άλλη πτυχή, αφορά τη βελτίωση της αποτελεσματικότητας της ακινητοποίησης των ενζύμων. Έχει δοκιμαστεί η απευθείας ακινητοποίηση του ενζύμου σε επιφάνειες ηλεκτροδίων (80), η οποία παρουσιάζει αρκετά μειονεκτήματα, όπως η ασθενής προστασία του ακινητοποιημένου ενζύμου και η περίπλοκη προεπεξεργασία της

επιφάνειας του ηλεκτροδίου πριν από την ακινητοποίηση. Αντίθετα, με την ακινητοποίηση του ενζύμου σε μια μεμβράνη, η ενζυμική μεμβράνη μπορεί να αντικατασταθεί εύκολα όταν η δραστηριότητα του ενζύμου έχει χαθεί. (79) Η χιτοζάνη, για παράδειγμα, ως υλικό σχηματίζει μεμβράνη και περιέχει μεγάλες ομάδες $-NH_2$ και $-OH$, το οποίο προτιμάται για τη διατήρηση της υψηλής βιολογικής δραστηριότητας του ακινητοποιημένου ενζύμου. Επιπλέον, παρουσιάζει μη τοξικές ιδιότητες και πολύ χαμηλό κόστος. Ως εκ τούτου, χρησιμοποιείται ευρέως ως υλικό φορέα για την ακινητοποίηση ενζύμων σε συνδυασμό με διάφορα νανοϋλικά. (78)

Μεταξύ των μεθόδων που αναφέρονται παραπάνω για τη βελτίωση της αγωγιμότητας, το Prussian Blue έχει προσελκύσει τεράστιο ενδιαφέρον για την κατασκευή ηλεκτροχημικών βιοαισθητήρων που διαθέτουν διεπαφή αγωγιμότητας, καταλυτικές ιδιότητες και ιδιότητες αγωγιμότητας. Χρησιμοποιώντας Prussian Blue για την τροποποίηση ηλεκτροδίου άνθρακα (GCE), μπορεί να βελτιωθεί η ηλεκτροκαταλυτική ικανότητα και να ενισχυθεί η μεταφορά ηλεκτρονίων. Επομένως, μπορούν να ληφθούν υψηλά αμπερομετρικά σήματα με αντίστοιχα χαμηλό όριο ανίχνευσης. (79)

Η Arduini F. και οι συνεργάτες της, έχουν επιδείξει τη δυνατότητα να εντοπιστούν μερικές σημαντικές θειόλες σε χαμηλό εφαρμοζόμενο δυναμικό (200 mV vs Ag/AgCl) με τη χρήση ενός τροποποιημένου screen printed ηλεκτροδίου με Prussian Blue. Το αποτέλεσμα ήταν η λήψη υψηλών αμπερομετρικών σημάτων, με ένα αντίστοιχο χαμηλό όριο ανίχνευσης για τη θειοχολίνη. Η καλή ευαισθησία του SP ηλεκτροδίου τροποποιημένου με Prussian Blue, η ευκολία τροποποίησης της επιφάνειας μαζί με την υψηλή σταθερότητα του στρώματος του Prussian Blue, οδήγησαν στη λεπτομερή διερεύνηση της δυνατότητας εφαρμογής αυτών των αισθητήρων για ανάλυση φυτοφαρμάκων. (68)

Οι Hart και Hartley ήταν οι πρώτοι που ανέδειξαν τα πλεονεκτήματα του Cobalt Phthalocyanine ως διαμεσολαβητή και την πιθανή εφαρμογή του για περιβαλλοντική παρακολούθηση φυτοφαρμάκων. Το καλύτερο παράδειγμα χρήσης αυτού του διαμεσολαβητή, από την άποψη της ευκολίας παραγωγής και της ευαισθησίας προς τη θειοχολίνη, εξακολουθεί να παραμένει το τροποποιημένο ηλεκτρόδιο Co-Phthalocyanine, το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως για την ανίχνευση φυτοφαρμάκων. (81)

Εν συντομία, με τη χρήση του ηλεκτροδίου Co-Phthalocyanine, επιτυγχάνεται μια ηλεκτροκαταλυτική διεργασία, κατά την οποία το Co^{2+} ανάγεται χημικά με τη θειοχολίνη προς Co^+ , η οποία στη συνέχεια ηλεκτροχημικώς επανοξειδώνεται σε Co^{2+} και το προκύπτον ανοδικό ρεύμα αντιπροσωπεύει το σήμα ανάλυσης. Το κύριο πλεονέκτημα της χρήσης αυτής της διαδικασίας ηλεκτροκαταλυτικής οξειδωσης είναι ότι το απαιτούμενο εφαρμοζόμενο δυναμικό του screen printed τροποποιημένου ηλεκτροδίου με Co-Phthalocyanine είναι σημαντικά χαμηλότερο από αυτό που απαιτείται σε ένα μη τροποποιημένο. (83)

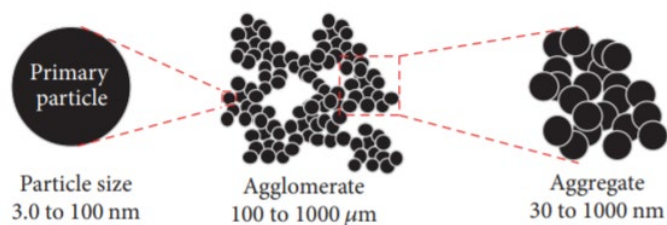
Στη βιβλιογραφία, έχουν, επίσης, χρησιμοποιηθεί τα νανοσωματίδια μαγνητήτη Fe_3O_4 ομοιογενώς διεσπαρμένα σε πολυμερικό δίκτυο χιτοζάνης με στόχο την κατάλληλη ακινητοποίηση του ενζύμου στην επιφάνεια ηλεκτροδίων χρυσού ή άνθρακα με ταυτόχρονη ενίσχυση της αγωγιμότητάς για βελτιστοποιημένη ανίχνευση. (70) (71) (72)

AChE Based Biosensor	Pesticide	Technique	Linear Response Range (nmol L ⁻¹)	LOD (nmol L ⁻¹)
AChE/Fe ₃ O ₄ -CH/GCE	Carbofuran	SWV/CV	5.0-90	3.6
MPS-AChE	Carbofuran	SWV	39-625	20
AChE-AuNPs-CaCO ₃	Malathion/C	EIS/Amperometry	0.1-100	0.1
PVA-AWP/Fe-Ni/NP AChE	Phosmet-oxon	CV/Amperometry	0.1-5	0.1
AChE-AuNPs/MPS/Au	Carbamate	CV/Amperometry	3-2 × 10 ³	1.0
Nano-silver/AChE/chitosan	Paraoxon	CV/Amperometry	0-3.63 × 10 ²	14.5
AChE/CS/Fe ₃ O ₄	Malathion	CV/Amperometry	0.5-20	0.3

Εικόνα 40: Ακινητοποίηση της AChE σε διάφορους τύπους ηλεκτροδίων

Το Carbon Black είναι ένα νανοϋλικό που αποτελείται τυπικά από καθαρό άνθρακα με ελάχιστη ποσότητα οξυγόνου, υδρογόνου και αζώτου. Η δομή του αποτελείται από σφαιρικό σχήμα που μπορεί να σχηματίσει συσσωματώματα (Εικόνα 41). Στη βιβλιογραφία, πολλές μελέτες έχουν αποδείξει ότι αυτό το υλικό όταν χρησιμοποιείται ως τροποποιητικός παράγοντας στην επιφάνεια ηλεκτροχημικού αισθητήρα, είναι σε θέση να βελτιώσει τη μεταφορά ηλεκτρονίων και να αυξήσει το μέγεθος του σήματος ανάλυσης. Αυτή η ιδιότητα μπορεί να αποδοθεί σε πολλά χαρακτηριστικά, όπως η υψηλή ηλεκτρική αγωγιμότητα και η μεγάλη ειδική επιφάνεια, γι'αυτό και έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως σε ηλεκτροχημικούς βιοαισθητήρες. (76)(78)

Επιπλέον, οι περιπτώσεις ηλεκτροδίων τροποποιημένων με CB για ηλεκτροανάλυση διαφόρων ουσιών αυξάνονται συνεχώς στη βιβλιογραφία, επειδή συχνά επιτυγχάνεται αυξημένη σταθερότητα και ακρίβεια σε συνδυασμό με χαμηλά όρια ανίχνευσης. (75)



Εικόνα 41: Σχηματική απεικόνιση της μορφολογίας του Carbon Black στη νανοκλίμακα (76)

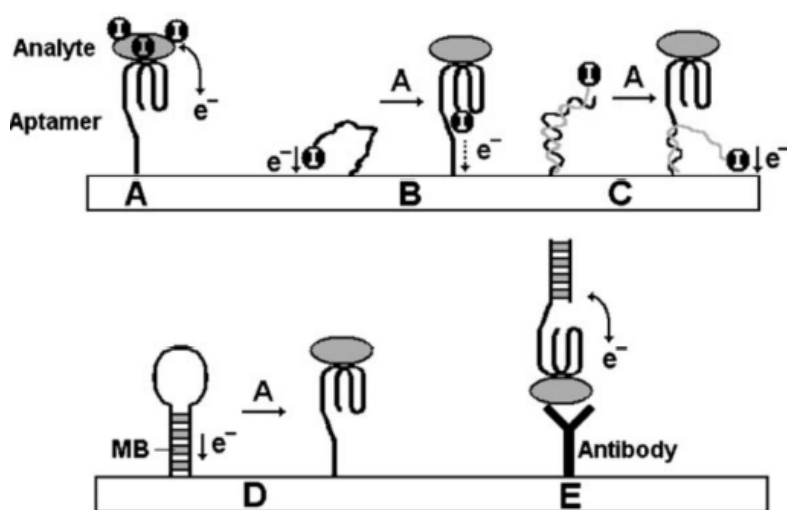
Οι Vicentini et al., χρησιμοποίησαν Carbon Black διεσπαρμένου σε χιτοζάνη για την τροποποίηση Glassy Carbon ηλεκτροδίου με τη μέθοδο drop casting, αποκαλύπτοντας την εξαιρετική ευαισθησία και την ταχύτερη ετερογενή ταχύτητα μεταφοράς ηλεκτρονίων σε σύγκριση με ένα ατροποποίητο ηλεκτρόδιο. Έτσι, αποδείχθηκαν τα πλεονεκτήματα χρήσης του CB ως παράγοντα τροποποίησης, τα οποία επιβεβαιώθηκαν και από την ομάδα της Arduini. Στην πραγματικότητα, βελτιώθηκαν οι ηλεκτροχημικές επιδόσεις των SP ηλεκτροδίων τροποποιημένων με CB N220 ως ανθρακούχο νανοϋλικό, κατασκευάζοντας SPEs με CB με τη μέθοδο drop casting, ατροποποίητα SPEs με σταθερές διασπορές CB σε ακετονιτρίλιο (ACN) ή σε μίγμα νερού με DMF. (73) (74)

Τα screen printed ηλεκτρόδια με Carbon black, περιλαμβάνουν τα πλεονεκτήματα των SPEs, όπως η δυνατότητα διάθεσης, η σμίκρυνση, η ευκολία τροποποίησης και η καταλληλότητα για μαζική παραγωγή, καθώς και τα πλεονεκτήματα του CB, όπως η σχέση κόστους-αποτελεσματικότητας και οι καλές ηλεκτροχημικές επιδόσεις της πρώτης ύλης. (74)

2.6 Σύστημα ανίχνευσης φθαλικών εστέρων

Όπως προκύπτει από την υποενότητα 2.3, το όριο ανίχνευσης που μπορεί να επιτευχθεί με την χρήση μοριακά αποτυπωμένων πολυμερών δεν επαρκεί, καθιστώντας την χρήση απταμερών την μοναδική ενδεδειγμένη λύση. Το πρόβλημα με τα απταμερή

είναι ότι η ανίχνευση κάποιου αναλύτη απ' αυτά και η πρόσδεση σε αυτά δεν συνεπάγεται παραγωγή ή κατανάλωση ηλεκτρονίων έχοντας ως συνέπεια να μην μπορούν να πραγματοποιηθούν ηλεκτροχημικές μετρήσεις αμπερομετρίας με τα μόρια αυτά καθ'αυτά. Λύση στο πρόβλημα αυτό μπορεί να δοθεί με την σήμανση του απταμερούς ή του αναλύτη με ένα ηλεκτροενεργό μόριο. Η πρόσδεση του αναλύτη στο ακινητοποιημένο απταμερές φέρνει κοντά στην επιφάνεια το ηλεκτροενεργό μόριο όπου και μπορεί να αναχθεί ή να οξειδωθεί παράγοντας κάποιο μετρήσιμο σήμα όπως φαίνεται και στην ακόλουθη εικόνα. (32)



Εικόνα 42: Σηματοδότηση του αναλύτη (A), του απταμερούς (B, D, E) ή ενός συμπληρωματικού κλώνου προς το απταμερές (C) μ' ένα ηλεκτροενεργό μόριο για την πραγματοποίηση αμπερομετρικών μετρήσεων.

Το μικρό μέγεθος των φθαλικών εστέρων καθιστά μη εφικτή την σήμανση τους, όπως και τον σχεδιασμό διατάξεων όπως αυτών στην Εικόνα 42E. Η δε σήμανση του ίδιου του απταμερούς (Εικόνα 42B,D) είναι μεν εφικτή όμως και βάσει βιβλιογραφίας προκύπτει ότι δεν είναι και η πλέον αξιόπιστη λύση για την επίτευξη ενός χαμηλού ορίου ανίχνευσης. (33) Σε μία δημοσίευσή τους, ο Yu Han και οι συνεργάτες του, με τη βοήθεια ενός απταμερούς που επιλέχθηκε για την ανίχνευση του DEHP, επέτυχαν ένα χαμηλό όριο ανίχνευσης (10 pM). Σημαντικό ρόλο στην ανίχνευση έπαιξε η παρουσία μιας συμπληρωματικής ως προς το απταμερές αλυσίδα, επισημασμένης με Ferrocene. Έτσι, με την πρόσδεση του αναλύτη με το απταμερές, η επισημασμένη συμπληρωματική αλυσίδα απομακρύνεται προς το κυρίως διάλυμα και ανιχνεύεται από την επιφάνεια. (7)

Οι τεχνικές που δε χρησιμοποιούν σήμανση των απταμερών, παράγουν ένα σήμα που σχετίζεται άμεσα με την αλληλεπίδραση του αναλύτη στόχου με το βιομόριο, σε αντίθεση με τις μεθόδους επισήμανσης όπου το σήμα βασίζεται στα μόρια που είναι προσαρτημένα στη δομή του μορίου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αποφυγή ζητημάτων, όπως η λανθασμένη διαδικασία σήμανσης. Επιπλέον, αναμένεται ότι οι τεχνικές ανίχνευσης χωρίς ετικέτες είναι πιο αναπαραγωγίσιμες σε σύγκριση με εκείνες που βασίζονται στην επισήμανση μορίων. Η ενσωμάτωση των απταμερών ως στοιχεία- βιοϋποδοχείς στο σχεδιασμό βιοαισθητήρων χωρίς σήμανση έχει βελτιώσει περαιτέρω την αναλυτική απόδοση των προσδιοριζόμενων ουσιών (μικρά μόρια π.χ. μυκοτοξίνες). Η μακροπρόθεσμη σταθερότητα και *in vitro* παραγωγή του απταμερούς μαζί με τις τεχνικές ανίχνευσης χωρίς ετικέτες καθιστούν αυτές τις αναλύσεις πολύ αποδοτικές από πλευράς κόστους.

Το φαινόμενο των μεταβολών της διαμόρφωσης του απταμερούς κατά τη σύνδεση του αναλύτη στόχου, προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα στην κατασκευή μεθόδων χωρίς σήμανση, όπως τα χαμηλά όρια ανίχνευσης. (86)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΕΙΑ

3.1 Βασικές έννοιες στην Ηλεκτροχημεία

3.1.1 Το ηλεκτρολυτικό διάλυμα σε επαφή με το ηλεκτρόδιο

Γενικά, ηλεκτρόδιο ονομάζεται οποιοσδήποτε ηλεκτρικός αγωγός χρησιμοποιείται έτσι ώστε να δημιουργεί ηλεκτρικό πεδίο ή ηλεκτρικό ρεύμα. Στην ηλεκτροχημεία, ηλεκτρόδιο ονομάζεται ο μεταλλικός αγωγός που είναι εμβαπτισμένος μέσα στο ηλεκτρολυτικό διάλυμα. Δεδομένου ότι η λειτουργία του ηλεκτροδίου ως τροφοδότη ηλεκτρικού ρεύματος δε μπορεί να συμβεί απουσία ηλεκτρολυτικού διαλύματος που να βρίσκεται σε επαφή με το ηλεκτρόδιο, ο όρος ηλεκτρόδιο περιγράφει το συνδυασμό ενός μεταλλικού αγωγού και ενός ιοντικού διαλύματος.

Όταν ένα ιόν βρίσκεται μέσα στο ηλεκτρολυτικό διάλυμα αλλά μακριά από την επιφάνεια του ηλεκτροδίου, αλληλεπιδρά με άλλα ιόντα που βρίσκονται στην ίδια περιοχή. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές δε διαφέρουν αν το ιόν βρίσκεται σε ένα άλλο σημείο του ηλεκτρολυτικού διαλύματος (μακριά όμως από την ηλεκτροδιακή επιφάνεια) δεδομένου ότι το διάλυμα είναι ένα ομογενές σύστημα. Έστω ότι το ιόν βρίσκεται πολύ κοντά στην ηλεκτροδιακή επιφάνεια. Στο σημείο αυτό το ιόν θα αλληλεπιδρά τόσο με τα γειτονικά του ιόντα όσο και με τα σωματίδια που αποτελούν το ηλεκτρόδιο.

Προφανώς, στην περιοχή κοντά στην ηλεκτροδιακή επιφάνεια οι δυνάμεις που ασκούνται στα γειτονικά ιόντα είναι διαφορετικές από αυτές που ασκούνται στα ιόντα τα οποία βρίσκονται στον κύριο όγκο του διαλύματος. Επιπλέον, οι δυνάμεις αυτές θα εξαρτώνται από την απόσταση μεταξύ της θέσης του ιόντος και της επιφάνειας του ηλεκτροδίου. Επομένως, η περιοχή του ηλεκτρολυτικού διαλύματος κοντά στην ηλεκτροδιακή επιφάνεια διαφέρει από το υπόλοιπο διάλυμα και αποκαλείται ηλεκτροδιακή διεπιφάνεια ή αλλιώς ηλεκτροχημική διπλοστοιβάδα.

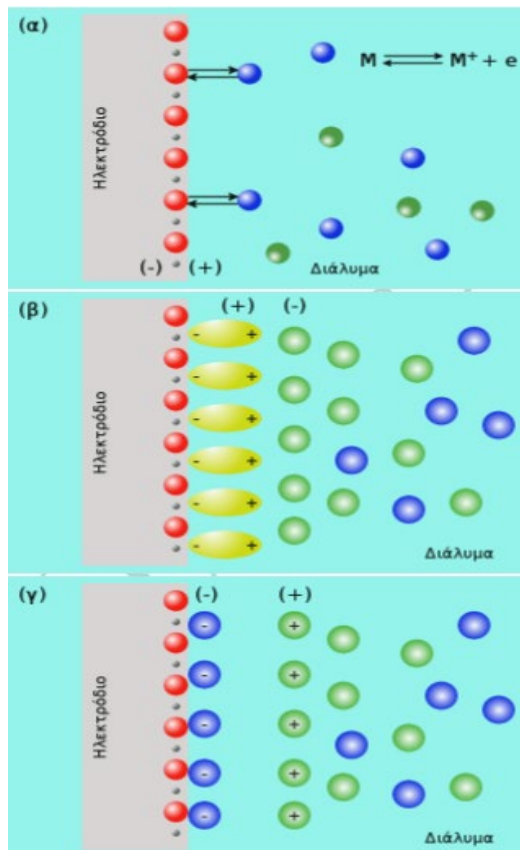
Στην ηλεκτροδιακή διεπιφάνεια θα εμφανισθεί μια διαφορά ηλεκτρικού δυναμικού, λόγω του διαχωρισμού του φορτίου. Τη στιγμή που οι δυο φάσεις έρχονται σε επαφή, φορτίο αρχίζει να μεταφέρεται κυρίως από τη μια φάση στην άλλη και ως εκ τούτου

δημιουργείται περίσσεια φορτίου στη μια φάση και έλλειψη φορτίου στην άλλη. Αυτού του είδους ανταλλαγή φορτίου έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση διαφοράς δυναμικού που θα αυξάνει μέχρι τη στιγμή που οι ρυθμοί της μεταφοράς φορτίου από τη μια στην άλλη φάση γίνουν ίσοι. Στο σημείο αυτό το σύστημα βρίσκεται σε ισορροπία. Η διαφορά δυναμικού στη διεπιφάνεια καθορίζει την ταχύτητα των ηλεκτροχημικών αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα στο ηλεκτροχημικό σύστημα.

Μια τυπική περίπτωση εμφάνισης διαφοράς δυναμικού στην ηλεκτροδιακή διεπιφάνεια λόγω ανταλλαγής φορτίου είναι το φαινόμενο που παρουσιάζεται με την εμφάνιση μεταλλικού ηλεκτροδίου (μέταλλο M) σε ένα διάλυμα άλατος (A) του M^+A^- . Όπως φαίνεται στην Εικόνα 36 (α), ιόντα από το μεταλλικό πλέγμα (κόκκινες σφαίρες) μεταπηδούν στο ηλεκτρολυτικό διάλυμα ως ιόντα M^+ . Ισορροπία θα επιτευχθεί όταν ο ρυθμός μετακίνησης ιόντων προς το διάλυμα είναι ίσος με το ρυθμό μετακίνησης ιόντων προς το μέταλλο. Ως αποτέλεσμα θα εμφανισθεί μια περίσσεια θετικού φορτίου προς την πλευρά του διαλύματος και περίσσεια αρνητικού φορτίου στο μέταλλο.

Ένας άλλος μηχανισμός εμφάνισης διαφοράς δυναμικού στην ηλεκτροδιακή διεπιφάνεια είναι η προσρόφηση. Η προσρόφηση σωματιδίων στην επιφάνεια ενός στερεού μπορεί να είναι δύο ειδών: (α) φυσική προσρόφηση λόγω δυνάμεων Van der Waals και (β) χημική (ειδική) προσρόφηση λόγω σχηματισμού ομοιοπολικών, μεταλλικών ή ιονικών δεσμών μεταξύ των προσροφημένων σωματιδίων και του προσροφητικού στερεού. Φυσική προσρόφηση παρατείνεται συνήθως στην περίπτωση ουδέτερων πολικών σωματιδίων. Η μια πλευρά του διπόλου του πολικού μορίου προσανατολίζεται προς τη διεπιφάνεια ενώ η άλλη προς τον κύριο όγκο της φάσης στην οποία ανήκει. Εφόσον μόνο η μια φάση είναι πολική (π.χ. υδατική φάση), η διαφορά δυναμικού θα εμφανισθεί εντός αυτής της φάσης, στην περιοχή που γειτνιάζει άμεσα με τη διεπιφάνεια (Εικόνα 43 (β)).

Αντίστοιχα, στη χημική προσρόφηση, η μεταλλική επιφάνεια δεν είναι περατή στα ιόντα τα οποία προσροφώνται και ως εκ τούτου η εμφανιζόμενη διαφορά δυναμικού είναι εντοπισμένη στην υγρή φάση στην περιοχή που γειτνιάζει άμεσα με τη διεπιφάνεια (Εικόνα 43(γ)).



Εικόνα 43 : (α) Ανταλλαγή φορτίου σε μεταλλικό ηλεκτρόδιο M εμβαπτισμένο σε διάλυμα άλατος του, MA, (β) φυσική προσρόφηση πολικών ουδέτερων μορίων και (γ) χημική προσρόφηση ιόντων. (35)

3.1.2 Ηλεκτροδιακές Διεργασίες

Τα ηλεκτρόδια του ηλεκτροχημικού στοιχείου αποτελούν την άνοδο και την κάθοδο του στοιχείου. Ανεξάρτητα από το είδος του στοιχείου, στην κάθοδο πραγματοποιούνται πάντοτε αντιδράσεις αναγωγής και στην άνοδο αντιδράσεις οξειδωσης. Ηλεκτρόδιο εργασίας (working electrode) είναι το ηλεκτρόδιο στο οποίο πραγματοποιείται η ελεγχόμενη ή παρακολουθούμενη ηλεκτροδιακή αντίδραση. Ηλεκτρόδιο αναφοράς (reference electrode) είναι το ηλεκτρόδιο το οποίο εμφανίζει σταθερό και επαναλήψιμο δυναμικό, ανεξάρτητο από τη σύσταση του διαλύματος και τις μεταβολές στην ένταση του ρεύματος και βοηθητικό ή αντίθετο ηλεκτρόδιο (counter electrode) είναι αυτό το οποίο αποτελείται από ένα αδρανές μέταλλο, διαμέσου του οποίου

διέρχεται το ρεύμα, ώστε να αποφεύγεται η διέλευση ρεύματος από το ηλεκτρόδιο αναφοράς.

Στα ηλεκτρόδια πραγματοποιούνται δύο τύποι διεργασιών: φαρανταϊκές (faradaic processes) και μη φαρανταϊκές (non faradaic processes). Στις φαρανταϊκές διεργασίες ή δράσεις, που διέπονται από το νόμο του Faraday (σύμφωνα με τον οποίο η ποσότητα της ουσίας που οξειδώνεται ή ανάγεται, είναι ανάλογη της ποσότητας του ηλεκτρισμού που διέρχεται από το διάλυμα), γίνεται μεταφορά ηλεκτρονίων διαμέσου της διεπιφάνειας ηλεκτροδίου – διαλύματος και επομένως λαμβάνει χώρα οξείδωση ή αναγωγή, γιατί δεν είναι δυνατόν να «επιβιώσει» ελεύθερο ηλεκτρόνιο στο διάλυμα. Τα ηλεκτρόδια στις φαρανταϊκές διεργασίες ονομάζονται ηλεκτρόδια μεταφοράς φορτίου και το παρατηρούμενο ρεύμα ονομάζεται φαρανταϊκό ρεύμα (faradaic current), I_F .

Στις μη φαρανταϊκές διεργασίες δε γίνεται μεταφορά ηλεκτρονίων διαμέσου της διεπιφάνειας ηλεκτροδίου – διαλύματος, γιατί δεν ευνοείται κινητικά ή θερμοδυναμικά. Τέτοιες διεργασίες είναι η προσρόφηση και η εκρόφηση ουσιών στο ηλεκτρόδιο και η αλλαγή ιδιοτήτων της διεπιφάνειας κατά τις αλλαγές του δυναμικού του ηλεκτροδίου ή της συστάσεως του διαλύματος. Παρόλο, όμως, που δε διακινούνται ηλεκτρόνια στις μη φαρανταϊκές διεργασίες, εντούτοις μπορεί να παρατηρηθεί διέλευση ρεύματος, έστω και παροδικά, όταν αλλάζει το δυναμικό ή η επιφάνεια του ηλεκτροδίου ή η σύσταση του διαλύματος. Το ρεύμα αυτό ονομάζεται χωρητικό ρεύμα (capacitive current), I_C .

Ένα ενδιαφέρον παράδειγμα μη φαρανταϊκής διεργασίας είναι η φόρτιση ενός ηλεκτροδίου, κατά την οποία το χωρητικό ρεύμα φορτίζει την ηλεκτρική διπλοστοιβάδα η οποία υπάρχει στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου, στην τιμή ισορροπίας, που αντιστοιχεί στο δυναμικό του ηλεκτροδίου. (36) Ο διαχωρισμός φορτίου ο οποίος έχει ως αποτέλεσμα τη διαφορά δυναμικού μεταξύ των δύο φάσεων μπορεί να θεωρηθεί ότι είναι ανάλογος με τη συσσώρευση φορτίου στις πλάκες ενός παράλληλου πυκνωτή. Με την εφαρμογή ενός πολωτικού δυναμικού, το φορτίο στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου μπορεί να ελεγχθεί, προκαλώντας ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του ηλεκτροδίου και του ηλεκτρολυτικού διαλύματος. Παρατηρείται διαχωρισμός θετικών και αρνητικών φορτισμένων ειδών, που προκαλείται από την ασυνέχεια στη διεπαφή και την επακόλουθη διακοπή της συμπεριφοράς του ηλεκτρολύτη στον κύριο όγκο του διαλύματος. Αυτή η κατανομή φορτίου είναι γνωστή ως ηλεκτρική διπλή στρώση και αρκετά μοντέλα έχουν αναπτυχθεί για να καθορίσουν τη φύση της διαδικασίας. (13)

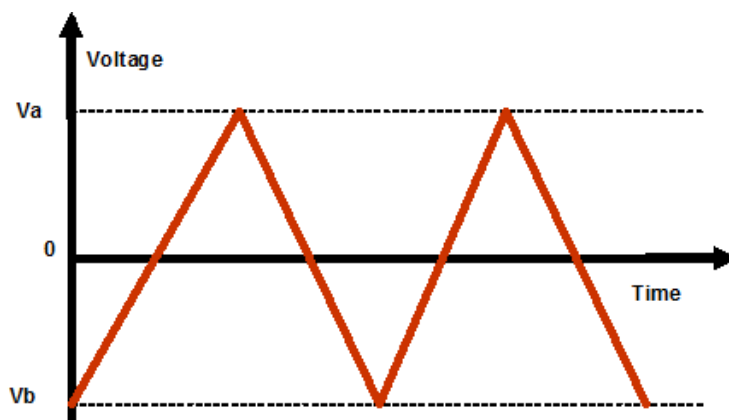
Παρακάτω, παρουσιάζονται οι πιο βασικές ηλεκτροαναλυτικές τεχνικές, οι οποίες χρησιμοποιούνται για τον χαρακτηρισμό της επιφάνειας ενός ηλεκτροδίου αλλά και για τη μελέτη των ηλεκτροχημικών αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα λόγω της μεταφοράς ηλεκτρονίων.

3.2 Κυκλική Βολταμετρία (CV)

Η βολταμετρία είναι μια ηλεκτροαναλυτική τεχνική κατά την οποία το ρεύμα στο ηλεκτρόδιο εργασίας μετράται ως συνάρτηση του εφαρμοζόμενου δυναμικού εντός ενός ηλεκτροχημικού κυττάρου και μπορεί να παρέχει αξιοσημείωτα λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με τον μηχανισμό της αντίδρασης ενδιαφέροντος. Ο όρος ηλεκτρόδιο εργασίας αποδίδεται στο ηλεκτρόδιο εκείνο στο οποίο συμβαίνει η οξειδοαναγωγική αντίδραση του συστήματος που μελετάται. Το ηλεκτροδιακό δυναμικό αποτελεί την ελεγχόμενη παράμετρο η οποία αναγκάζει τα μόρια ή τα ιόντα που βρίσκονται στο διάλυμα, να αναχθούν ή να οξειδωθούν πάνω στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας. Το δυναμικό μπορεί να εφαρμοστεί κατά διάφορους συστηματικούς τρόπους, όπως γραμμική, παλμική, εναλλασσόμενη, κλιμακωτή ή άλλη μεταβολή σε σχέση με το χρόνο.

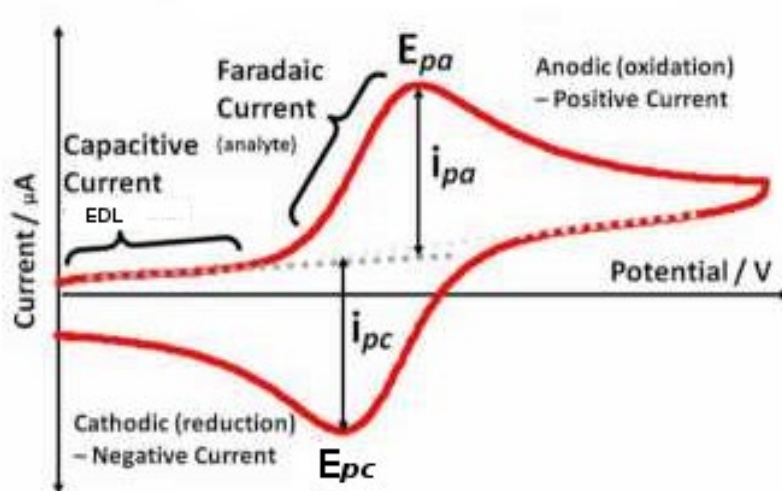
Η κυκλική βολταμετρία χρησιμοποιείται, κυρίως, για τη μελέτη του μηχανισμού οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων και τον χαρακτηρισμό των οξειδοαναγωγικών ιδιοτήτων των διάφορων ενώσεων και παρέχει γρήγορα σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τη θερμοδυναμική των διαδικασιών οξειδοαναγωγής, την κινητική των ετερογενών αντιδράσεων μεταφοράς ηλεκτρονίων και τις συζευγμένες χημικές αντιδράσεις ή διεργασίες προσρόφησης. Συχνά αποτελεί το πρώτο πείραμα το οποίο εκτελείται σε μια ηλεκτροχημική μελέτη.

Στην κυκλική βολταμετρία εφαρμόζεται επί του ηλεκτροδίου εργασίας τριγωνικό κύμα δυναμικού, πρώτα προς μία διεύθυνση και ύστερα συμμετρικά στην αντίθετη διεύθυνση, αυτό το κύμα δυναμικού επαναλαμβάνεται ταχέως. Το δυναμικό σαρώνεται στην καθοδική κατεύθυνση, στη διαδικασία αναγωγής και στη συνέχεια αντίστροφα στην ανοδική κατεύθυνση μετά τον τερματισμό του κύματος αναγωγής (Εικόνα 44).



Εικόνα 44: Τριγωνικό δυναμικό που εφαρμόζεται στην κυκλική βολταμετρία(13)

Στο παρακάτω σχήμα (Εικόνα 45), φαίνεται το τυπικό κυκλικό βολταμμογράφημα για ένα αντιστρεπτό σύστημα αναγωγής.



Εικόνα 45 : Τυπικό κυκλικό βολταμμογράφημα

Σύμφωνα με ένα τυπικό κυκλικό βολταμμογράφημα απεικονίζεται το εφαρμοζόμενο δυναμικό συναρτήσει του ρεύματος που προκύπτει. Η κορυφή στα θετικά ρεύματα αφορά την οξειδωτική διαδικασία, ενώ η κορυφή στα αρνητικά ρεύματα αφορά την αναγωγική διαδικασία. Σημαντική είναι και η διαφορά (ΔE : peak to peak separation) της απόστασης μεταξύ των δυο κορυφών στον άξονα χ , καθώς δείχνει την καθαρότητα της επιφάνειας εργασίας του ηλεκτροδίου. Πιο συγκεκριμένα, για ένα ηλεκτρόδιο χρυσού, η ιδανική τιμή

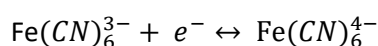
είναι 59 mV, ωστόσο είναι αδύνατο να επιτευχθεί. Όσο τροποποιείται η επιφάνεια, η διαφορά αυτή αυξάνεται, όπως διαφοροποιείται και η μορφή του γραφήματος ανάλογα.

Η ισορροπία στο σύστημα περιγράφεται από την εξίσωση του Nernst (Εξίσωση 1).

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{(Ox)}{(Red)} = E^0 + 2.3026 \frac{RT}{nF} \log_{10} \frac{(Ox)}{(Red)}$$

Εξίσωση 3 : Εξίσωση Nernst

Η σχέση αυτή συσχετίζει το δυναμικό ενός ηλεκτροχημικού κελιού (E) με το πρότυπο δυναμικό (E^0), καθώς και τις διαδικασίες οξειδωσης και αναγωγής του αναλύτη στο σύστημα κατά την ισορροπία. Με F συμβολίζεται η σταθερά Faraday, με R η παγκόσμια σταθερά των αερίων, με n ο αριθμός των ηλεκτρονίων και με T η θερμοκρασία. Πολύ συχνά στη βιβλιογραφία, ως οξειδοαναγωγικό ζεύγος χρησιμοποιείται το $K_3Fe(CN)_6$ - $K_4Fe(CN)_6$ (γνωστό ως Ferri/Ferrocyanide) σε βοηθητικό ηλεκτρολυτικό διάλυμα KCl. (36) Η αντίδραση που λαμβάνει χώρα φαίνεται παρακάτω.



Εξίσωση 4 : Οξειδοαναγωγικό ζεύγος

3.3 Ηλεκτροχημική Φασματοσκοπία Εμπέδησης (EIS)

Η αντίσταση ορίζεται ως η ικανότητα ενός στοιχείου ενός κυκλώματος να αντιστέκεται στη ροή του ηλεκτρικού ρεύματος. Σύμφωνα με το νόμο του Ohm ορίζεται ως το πηλίκο του δυναμικού E προς το ρεύμα I.

$$R = \frac{E}{I}$$

Εξίσωση 5 : Νόμος του Ohm

Η χρήση αυτής της εξίσωσης περιορίζεται μόνο σε ένα ηλεκτρικό στοιχείο, τον ιδανικό αντιστάτη. Μια ιδανική αντίσταση έχει τις εξής βασικές ιδιότητες. Ακολουθεί το νόμο του Ohm σε όλα τα επίπεδα ρεύματος και τάσης, η αντίσταση είναι ανεξάρτητη της

συχνότητας και τα σήματα ρεύματος και τάσης του εναλλασσόμενου ρεύματος μέσω μιας αντίστασης βρίσκονται σε φάση μεταξύ τους.

Οι περισσότερες πραγματικές εφαρμογές περιέχουν πιο περίπλοκα στοιχεία κυκλώματος και πιο σύνθετη συμπεριφορά. Η εμπέδηση αντικαθιστά την αντίσταση ως μια γενικότερη παράμετρο κυκλώματος. Η εμπέδηση ή αλλιώς σύνθετη αντίσταση ορίζεται ως η συνολική αντίσταση στην κίνηση των ηλεκτρονίων μέσα σε ένα ηλεκτροχημικό στοιχείο, προερχόμενη από αντιστάσεις, πυκνωτές και πηνία. Μονάδα μέτρησης είναι το 1 Ohm. Σε αντίθεση με την αντίσταση δεν περιορίζεται μόνο στον ιδανικό αντιστάτη, αλλά χρησιμοποιείται σε όλα τα στοιχεία. (37)

Η ηλεκτροχημική εμπέδηση μετριέται συνήθως με την εφαρμογή ενός δυναμικού εναλλασσόμενου ρεύματος σε ένα ηλεκτροχημικό στοιχείο και στη συνέχεια μετρώντας το ρεύμα μέσα στο κελί. Για παράδειγμα, αν εφαρμοστεί ημιτονοειδής δυναμική διέγερση, η απόκριση σε αυτό το δυναμικό είναι ένα σήμα ρεύματος AC. Αυτό το σήμα ρεύματος μπορεί να αναλυθεί ως άθροισμα ημιτονοειδών συναρτήσεων (σειρές Fourier). Σε ένα γραμμικό σύστημα, η τρέχουσα απόκριση σε ένα ημιτονοειδές δυναμικό θα είναι ημιτονοειδής στην ίδια συχνότητα αλλά μετατοπισμένη κατά μια φάση φ . Το σήμα διέγερσης εκφραζόμενο σαν συνάρτηση του χρόνου, είναι της μορφής

$$E_t = E_0 \sin(\omega t)$$

όπου E_t είναι το δυναμικό σε χρόνο t , E_0 το πλάτος του σήματος και ω η γωνιακή συχνότητα. Η σχέση μεταξύ της γωνιακής συχνότητας ω (εκφρασμένη σε rad/second) και της συχνότητας f (εκφρασμένη σε Hertz) είναι:

$$\omega = 2\pi f$$

Σε ένα γραμμικό σύστημα, το αποκρινόμενο σήμα I_t είναι μετατοπισμένο κατά μια φάση (φ) και έχει διαφορετικό πλάτος, I_0 όπως φαίνεται παρακάτω:

$$I_t = I_0 \sin(\omega t + \varphi)$$

Μια έκφραση ανάλογη του νόμου του Ohm επιτρέπει τον υπολογισμό της εμπέδησης ενός συστήματος με τον εξής τρόπο:

$$Z = \frac{E_t}{I_t} = \frac{E_0 \sin(\omega t)}{I_0 \sin(\omega t + \varphi)} = Z_0 \frac{\sin(\omega t)}{\sin(\omega t + \varphi)}$$

Συνεπώς η εμπέδηση εκφράζεται αναφορικά με το μέγεθος Z_0 και τη μετατόπιση φάσης φ . Επίσης, με τη σχέση του Euler

$$\exp(j\varphi) = \cos\varphi + j\sin\varphi$$

προκύπτει το εξής για το δυναμικό και το ρεύμα:

$$E_t = E_0 \exp(j\omega t) \text{ και } I_t = I_0 \exp(j\omega t - \varphi)$$

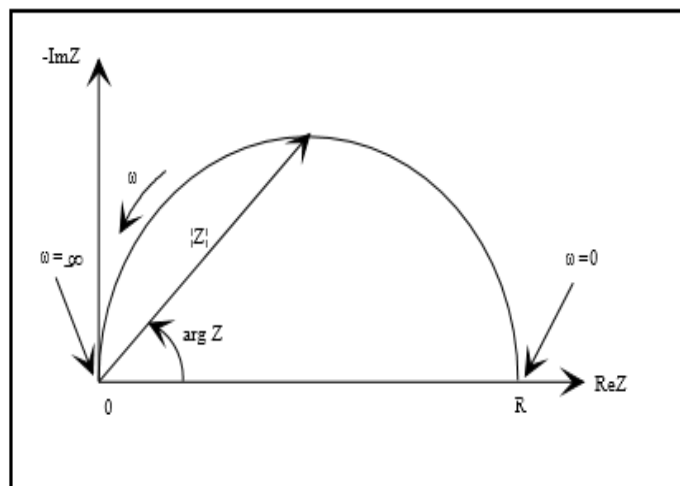
Εξίσωση 6: Μιγαδική εξίσωση δυναμικού και ρεύματος

Τελικά, η εμπέδηση αναπαρίσταται ως ένας μιγαδικός αριθμός, όπως φαίνεται παρακάτω.

$$Z(\omega) = \frac{E}{I} = Z_0 \exp(j\varphi) = Z_0(\cos\varphi + j\sin\varphi)$$

Εξίσωση 7: Εμπέδηση

Σύμφωνα με την Εξίσωση 4 η έκφραση για το $Z(\omega)$ αποτελείται από ένα πραγματικό και ένα φανταστικό μέρος. Αν το φανταστικό μέρος απεικονιστεί γραφικά στον X- άξονα και το φανταστικό στον Y- άξονα, λαμβάνουμε ένα διάγραμμα Nyquist, όπως αυτό στην Εικόνα 39.

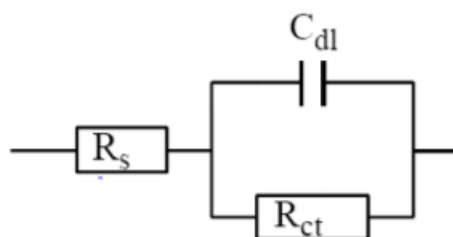


Εικόνα 46 : Διάγραμμα Nyquist

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 46, ο Y- άξονας είναι αρνητικός και κάθε σημείο του διαγράμματος δηλώνει την εμπέδηση σε μια συγκεκριμένη συχνότητα. Επίσης, οι χαμηλές συχνότητες βρίσκονται στα δεξιά του διαγράμματος και οι υψηλότερες στα αριστερά. Η

εμπέδηση στα διαγράμματα αυτά μπορεί να αναπαρασταθεί με ένα διάνυσμα του οποίου η αρχή ταυτίζεται με την αρχή των αξόνων του συστήματος συντεταγμένων και το πέρας βρίσκεται σε απόσταση ίση με το μέτρο της διανυσματικής ποσότητας στραμμένο κατά γωνία $\varphi = \arg Z$. Το αρνητικό των διαγραμμάτων αυτών είναι πως κοιτάζοντας κάποιο σημείο δεν μπορεί κάποιος να καταλάβει σε ποια συχνότητα αντιστοιχεί το σημείο αυτό.

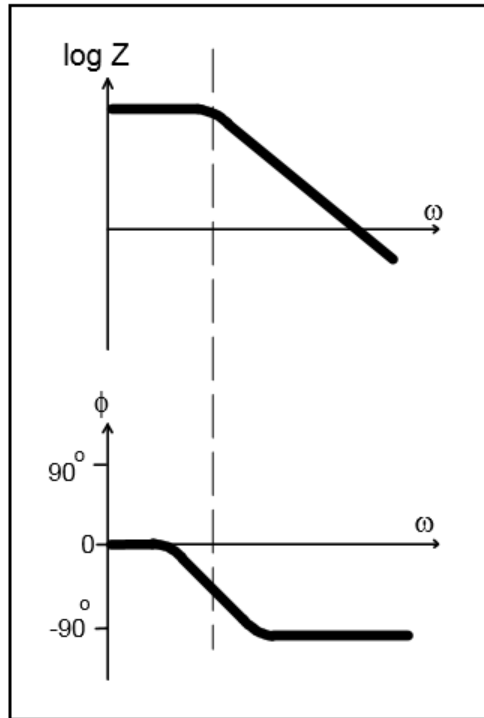
Σε αυτό το σημείο, αξίζει να αναφερθεί ότι η Εικόνα 46 προκύπτει από το ισοδύναμο ηλεκτρικό κύκλωμα που φαίνεται παρακάτω.



Εικόνα 47 : Ισοδύναμο ηλεκτρικό κύκλωμα Randles

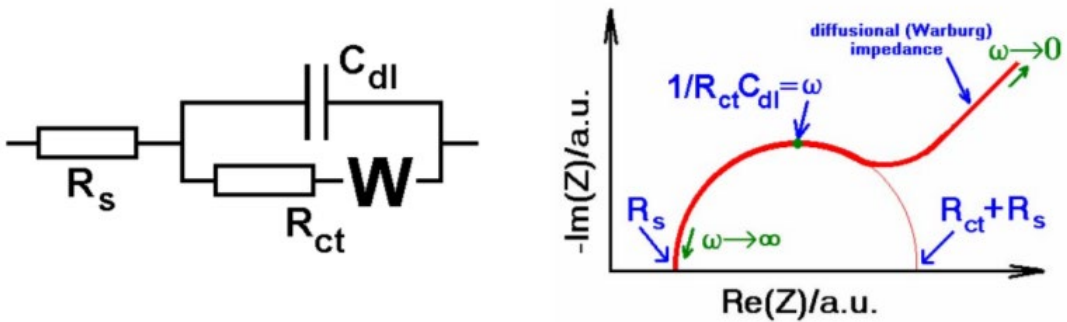
Όπου R_s είναι η ωμική αντίσταση του διαλύματος, C_{dl} η χωρητικότητα της ηλεκτρικής διπλοστιβάδας και R_{ct} η αντίσταση μεταφοράς φορτίου. Το συγκεκριμένο κύκλωμα αφορά τη διεπιφάνεια ηλεκτροδίου-διαλύματος σε ένα στοιχείο, όπου η χωρητικότητα αποδίδεται στη φόρτιση/εκφόρτιση της ηλεκτροχημικής διπλοστιβάδας. Παράλληλα υπάρχει η αντίσταση R_{ct} που αποδίδεται σε μια φαρανταϊκή αντίδραση (αντίδραση μεταφοράς φορτίου στην επιφάνεια των οπλισμών του πυκνωτή). Σε σειρά με το κύκλωμα υπάρχει και η ωμική αντίσταση του διαλύματος R_s . Έτσι σχηματίζεται το ισοδύναμο κύκλωμα Randles.

Μια διαφορετική παρουσίαση της μεθόδου προκύπτει από το διάγραμμα Bode. Η εμπέδηση παριστάνεται γραφικά με το δεκαδικό λογάριθμο της συχνότητας στον άξονα x και στον άξονα y από τη μια πλευρά είναι η απόλυτη τιμή της εμπέδησης ($|Z| = Z_0$) και από την άλλη πλευρά η απόλυτη τιμή της μετατόπισης της φάσης φ . Σε αντίθεση με το διάγραμμα Nyquist το διάγραμμα Bode δίνει πληροφορίες για τη συχνότητα.



Εικόνα 48 : Διάγραμμα Bode

Ένα παράδειγμα κυκλώματος που χρησιμοποιείται συχνά μοιάζει πολύ με το ισοδύναμο κύκλωμα Randles με τη διαφορά ότι έχει εισαχθεί το στοιχείο Warburg (W) άπειρου μήκους διάχυσης. Η παράμετρος W αντιστοιχεί στο μέτρο της σύνθετης αντίστασης σε κυκλική συχνότητα ω_0 και έχει διαστάσεις αντίστασης. Αυτό το ισοδύναμο κύκλωμα καθώς και το διάγραμμα εμέδησής του παρουσιάζονται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 49 : Ισοδύναμο κύκλωμα Randles που περιλαμβάνει το στοιχείο Warburg και το διάγραμμα εμέδησής του

Σχετικά με το διάγραμμα εμπέδησης που φαίνεται στην Εικόνα 28, η καμπύλη που μοιάζει με ημικύκλιο $[R_s, R_{ct}+R_s]$ αφορά τον κινητικό έλεγχο, ενώ η ευθεία στο δεξί μέρος, αφορά τη διάχυση, δηλαδή τη μεταφορά μάζας. Εάν το σύστημα είναι κινητικά άργο, δηλαδή έχει μεγάλο R_{ct} και περιορισμένη περιοχή συχνοτήτων όπου η μεταφορά μάζας είναι σημαντική. Αν το R_{ct} είναι μικρό, τότε το σύστημα είναι πιο ευκίνητο.

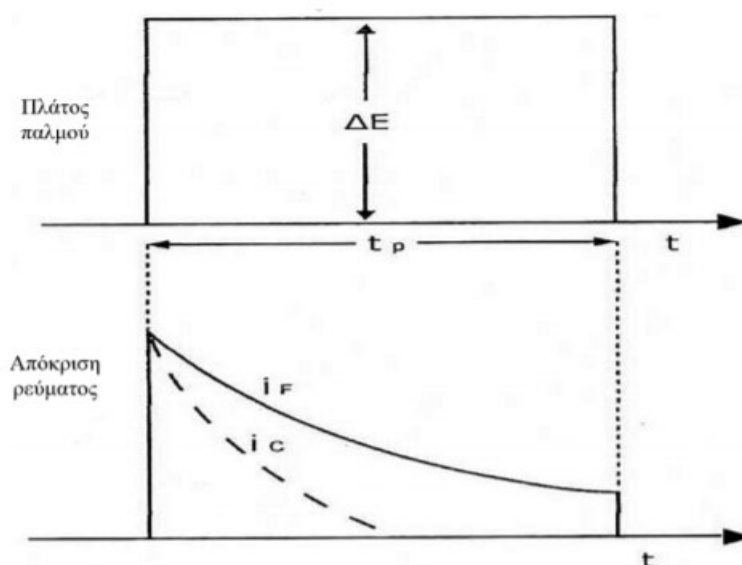
Ορισμένα από τα πλεονεκτήματα της φασματοσκοπίας ηλεκτροχημικής εμπέδησης είναι τα παρακάτω, τα οποία την καθιστούν ιδανική μέθοδο για την ανάλυση της τροποποιημένης ή μη επιφάνειας του ηλεκτροδίου. (38)

- Οι πληροφορίες που παρέχει η εμπέδηση είναι περισσότερες από αυτές που παρέχονται από τις τεχνικές συνεχούς ρεύματος ή από μετρήσεις απλής συχνότητας.
- Μέσω της εμπέδησης μπορούν να ανιχνευθούν δυο ή και περισσότερες αντιδράσεις που λαμβάνουν μέρος, είτε προσροφητικές είτε εκροφητικές.
- Μπορούν να εντοπιστούν αντιδράσεις περιορισμένης διάχυσης, π.χ. διάχυση μέσω ενός παθητικού φιλμ.
- Επίσης παρέχει πληροφορίες σχετικά με τη χωρητική συμπεριφορά του συστήματος.
- Με την εμπέδηση, παρέχονται και πληροφορίες σχετικά με την ταχύτητα μεταφοράς των ηλεκτρονίων.
- Χρησιμοποιείται για τη μελέτη της ηλεκτροχημικής σύνθεσης των υλικών και την κινητική της αντίδρασης κατάλυσης.

3.4 Διαφορική Παλμική Βολταμετρία (DPV)

Με την παλμική βολταμετρία (pulse voltammetry) προκαλείται σημαντική μείωση του ανεπιθύμητου χωρητικού ρεύματος και βελτίωση της ευαισθησίας των αναλυτικών προσδιορισμών. Η τεχνική στηρίζεται στην εφαρμογή παλμού σε σταθερό ή αυξανόμενο δυναμικό επάνω στο ηλεκτρόδιο εργασίας και διακρίνεται σε κανονική και διαφορική παλμική. Μετά την εφαρμογή του παλμού, το χωρητικό ρεύμα φθίνει ταχέως, ενώ το φαρανταιϊκό βραδύτερα. Εξετάζοντας το ρεύμα στα τελευταία χιλιοστοδευτερόλεπτα της διάρκειας του παλμού, το ρεύμα είναι σχεδόν φαρανταιϊκό. (Εικόνα 50) Η ευαισθησία αυξάνεται πέντε έως επτά φορές συγκρινόμενη με αυτήν της κλασικής πολαρογραφίας.

Στη διαφορική παλμική βολταμετρία (differential pulse voltammetry, DPV) οι παλμοί είναι σταθερού πλάτους και υπερτίθενται σε γραμμικώς μεταβαλλόμενο δυναμικό. Η μέτρηση του ρεύματος γίνεται δύο φορές: πριν την εφαρμογή και αμέσως μετά το τέλος του παλμού. Το μέγεθος του πρώτου ρεύματος αφαιρείται αυτόματα από το μέγεθος του δευτέρου και αυτή η διαφορά του ρεύματος παριστάνεται γραφικά σε σχέση με το εφαρμοζόμενο δυναμικό.



Εικόνα 50: Δυναμικό και ρεύμα κατά τη διάρκεια του παλμού στην παλμική βολταμετρία(36)

3.5 Αμπερομετρία

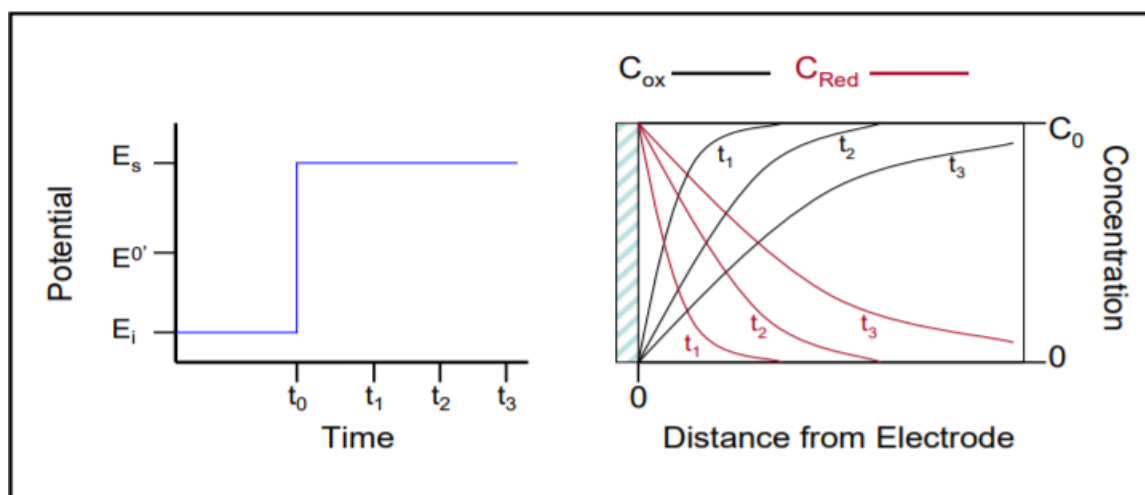
Η αμπερομετρία στη χημεία είναι η ανίχνευση ιόντων σε ένα διάλυμα και βασίζεται στις αλλαγές στο ηλεκτρικό ρεύμα συναρτήσει του χρόνου. Εφαρμόζεται ένα σταθερό δυναμικό E_i για μια χρονική διάρκεια t_i και μετράται το ρεύμα. Η απόκριση ρεύματος-χρόνου αντανακλά την αλλαγή της κλίσης της συγκέντρωσης μιας ουσίας κοντά στην επιφάνεια, με την προϋπόθεση ότι η μέτρηση γίνεται εφαρμόζοντας το σωστό δυναμικό.

Η χρονοαμπερομετρία χρησιμοποιείται συχνά για τη μέτρηση του συντελεστή διάχυσης των ηλεκτροενεργών ειδών ή της επιφάνειας του ηλεκτροδίου εργασίας.

Πιο συγκεκριμένα, έστω ότι εξετάζεται μια κατάσταση όπου ένα σταθερό ηλεκτρόδιο βυθίζεται σε ένα διάλυμα που περιέχει την οξειδωμένη μορφή (Ox) ενός οξειδωαναγωγικού ζεύγους σε κάποια γνωστή αρχική συγκέντρωση (C_0). Αρχικά το

ηλεκτρόδιο τοποθετείται σε ένα δυναμικό (E_i) θετικότερο από το E_0 για το οξειδωαναγωγικό ζεύγος, διασφαλίζοντας ότι μόνο το η οξειδωμένη μορφή (Ox) είναι παρούσα στο διάλυμα. Το διάλυμα περιέχει επίσης περίσσεια κάποιου αδρανούς ηλεκτρολύτη με στοχο να διασφαλιστεί ότι η ροή στο ηλεκτρόδιο είναι αυστηρά ελεγχόμενη με διάχυση. Σε ένα χρόνο t_0 , το δυναμικό αυξάνεται σε μια τιμή σημαντικά αρνητικότερη από το E_0 για το οξειδωαναγωγικό ζεύγος E_s και η οξειδωμένη μορφή (Ox) στην περιοχή του ηλεκτροδίου ανάγεται αμέσως (Red).

Ως συνέπεια αυτής της μετατροπής, η συγκέντρωση της οξειδωμένης μορφής (Ox) πολύ κοντά στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου μειώνεται στο μηδέν από την αρχική του συγκέντρωση. Αυτό οδηγεί στο σχηματισμό βαθμίδωσης της συγκέντρωσης της οξειδωμένης μορφής (Ox), μέσω της οποίας η τελευταία από το μεγαλύτερο μέρος του διαλύματος πρέπει να διαχέεται στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου, όπου αμέσως ανάγεται (Red). Όσο περισσότερο μένει το ηλεκτρόδιο σε αυτό το αναγωγικό δυναμικό, τόσο πιο μακριά από το ηλεκτρόδιο εκτείνεται η περιοχή που εξαντλείται η οξειδωμένη μορφή (Ox), και ονομάζεται στρώμα διάχυσης. Μια παρόμοια αλλά αντίθετη βαθμίδωση πραγματοποιείται για την αναγωγή, η οποία μετά το σχηματισμό είναι ελεύθερη να διαχυθεί μακριά από την επιφάνεια των ηλεκτροδίων, φτάνοντας περαιτέρω στο μεγαλύτερο μέρος του διαλύματος με την πάροδο του χρόνου. (12)



Εικόνα 51: Αριστερά το διάγραμμα εφαρμοζόμενου δυναμικού συναρτήσει του χρόνου. Δεξιά το διάγραμμα συγκέντρωσης του οξειδωαναγωγικού ζεύγους συναρτήσει της απόστασης από την επιφάνεια του ηλεκτροδίου(12)

Στην χρονοαμπερομετρία, η εξίσωση Cottrell είναι η πιο χρήσιμη και περιγράφει το παρατηρούμενο ρεύμα (σε επίπεδο ηλεκτρόδιο) ανά πάσα στιγμή ακολουθούμενο από ένα μεγάλο βήμα δυναμικής προώθησης σε αναστρέψιμη οξειδωαναγωγική αντίδραση ως συνάρτηση του $(t)^{-1/2}$.

$$i_t = \frac{n * F * A * C_0 * D_0^{1/2}}{\pi^{1/2} * t^{1/2}}$$

Εξίσωση 8: Εξίσωση Cottrell

Όπου, n ο στοιχειομετρικός αριθμός των ηλεκτρονίων της αντίδρασης, F η σταθερά Faraday (96,485 C/equivalent), A η επιφάνεια του ηλεκτροδίου (cm^2), C_0 η συγκέντρωση των ηλεκτροενεργών στοιχείων (mol/cm^3) και D_0 ο συντελεστής διάχυσης για τα ηλεκτροενεργά στοιχεία (cm^2/s). Το ρεύμα πέφτει με το χρόνο σύμφωνα με την εξίσωση Cottrell επειδή το υλικό πρέπει να διαχέεται στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου για να αντιδράσει. (12)

Οι αμπερομετρικοί αισθητήρες βασίζονται σε ετερογενείς αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων. Παρακολουθούν, με άλλα λόγια, το ρεύμα που σχετίζεται με την οξείδωση και/ή την αναγωγή ενός ηλεκτροενεργού είδους στην επιφάνεια ενός ηλεκτροδίου εργασίας, αφού η αντίσταση του ηλεκτρολύτη είναι χαμηλή. Πολώνεται το ηλεκτρόδιο εργασίας σε ένα κατάλληλο δυναμικό σε σχέση με το ηλεκτρόδιο αναφοράς, έτσι ώστε ο ρυθμός της όλης διαδικασίας να μπορεί να ελεγχθεί με μεταφορά μάζας. Το γεγονός ότι οι αμπερομετρικοί αισθητήρες είναι σε θέση να ανιχνεύσουν συγκεντρώσεις της αναλυόμενης ουσίας στην κλίμακα από 10^{-8} έως 10^{-9} M έχει ως αποτέλεσμα την ευρεία χρήση τους για μετρήσεις σε βιολογικά μέσα και ως εκ τούτου παρουσιάζουν τους πλέον ανεπτυγμένους και μελετημένους αισθητήρες.

Με τη σύζευξη ενός αμπερομετρικού αισθητήρα σε ένα ένζυμο, παίρνουμε το πρόσθετο πλεονέκτημα της υψηλής εξειδίκευσης και επιλεκτικότητας που προσφέρει το ένζυμο. Η καταλυτική αντίδραση που συμβαίνει στην επιφάνεια ενός ηλεκτροδίου εργασίας, όταν ένα ένζυμο είναι παρουσία του υποστρώματός του, δημιουργεί ένα ρεύμα ανάλογο με τη συγκέντρωση του παραγόμενου ή καταναλισκόμενου είδους. (13) Γενικότερα, με τη βοήθεια της χρονοαμπερομετρίας, μπορεί να μετρηθεί η συγκέντρωση μιας ουσίας ως συνάρτηση του ρεύματος σε έναν καθορισμένο χρόνο και να αναλυθεί το σχήμα της καμπύλης ρεύματος-χρόνου με σκοπό τη μελέτη συζευγμένων χημικών αντιδράσεων.

ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4.1 Σκοπός της εργασίας

Σκοπό της παρούσης εργασίας αποτέλεσε η κατασκευή ενός ηλεκτροχημικού ενζυμικού αισθητήρα με στόχο την ανίχνευση φυτοφαρμάκων και ενός ηλεκτροχημικού βιοαισθητήρα βασισμένο στα απταμερή για την ανίχνευση φθαλικών ενώσεων. Πιο συγκεκριμένα, με βάση τη βιβλιογραφία έγινε προσπάθεια εφαρμογής κάποιων πρωτοκόλλων για κάθε είδος βιοαισθητήρα κι έπειτα βελτίωσης των αποτελεσμάτων.

Για την περίπτωση του ενζυμικού βιοαισθητήρα, τροποποιήθηκαν με διάφορες χημείες οι επιφάνειες των ηλεκτροδίων με στόχο την επίτευξη υψηλότερων σημάτων για την ακριβέστερη ανίχνευση των επιθυμητών ουσιών. Επιπλέον, προσδιορίστηκαν οι ηλεκτροχημικές μέθοδοι χαρακτηρισμού των επιφανειών και οι τεχνικές ανίχνευσης, όπως επίσης μελετήθηκαν η συγκέντρωση αλλά και οι συνθήκες λειτουργίας του ενζύμου.

4.2 Συσκευές και υλικά

Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται οι συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν καθ' όλη τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρωματομετρίας και ηλεκτροχημείας, τα αναλώσιμα και τα αντιδραστήρια.

Συσκευές - Όργανα
Επωαστήρες (incubator) διαφόρων θερμοκρασιών
Φασματοφωτόμετρο THE SPARK® MULTIMODE MICROPLATE READER, TECAN
Πεχάμετρο
Ψηφιακό μαγνητικό stirrer
Αναλυτικός ζυγός ακριβείας
BioLogic Ποτενσιοστάτης SP-200

Ηλεκτροχημικός κονέκτορας, Metrohm Dropsens
Ανακινητήρας σωληναρίων (vortex)
Ultrasonic Bath

Πίνακας 3: Συσκευές και όργανα που χρησιμοποιήθηκαν

Αναλώσιμα
Δοκιμαστικοί σωλήνες πολυπροπυλενίου μιας χρήσης των 15 και 50ml, Falcon
Eppendorf tubes 1.5 mL
Στατώ σωληναρίων
Πιπέτες 1000, 200, 20, 2 μ L
Ποτήρια ζέσεως 100, 500 και 1000 mL
Ογκομετρικοί σωλήνες 100 και 500 mL
Υδροβολέας για διπλά αποσταγμένο νερό
96-well microplate Flat Transparent, Greiner Bio-One
Τρυβλία Petri πλαστικά
Σπάτουλα ζυγίσματος μικρών ποσοτήτων
Μεταλλικές λαβίδες

Πίνακας 4: Αναλώσιμα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν

Αντιδραστήρια	Εταιρία
11-Mercaptoundecanoic Acid	Sigma Aldrich
1x PBS	
4-Aminobenzoic Acid (4-ABA)	Sigma Aldrich
5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid)	Sigma Aldrich
Acetic Acid	Sigma Aldrich
Alumina Slurry, 0.3 μ m	
BSA Bovine Serum Albumin	Sigma Aldrich
CaCl ₂ (Calcium Chloride)	
Carbofuran	Sigma Aldrich
Carbon Black powder VXC72R	Cabot

Chitosan (low molecular weight)	Sigma Aldrich
Chitosan (medium molecular weight)	Sigma Aldrich
Chlorpyrifos	Sigma Aldrich
DEHP (2-ethylhexyl phthalate)	Sigma Aldrich
DEHP aptamer	Sigma Aldrich
DINP (Diisononyl phthalate)	Sigma Aldrich
DMF	Sigma Aldrich
Fe ₃ O ₄ Νανοδοματίδια μαγνητική	
FeCl ₃	
Glutaraldehyde 25%	AppliChem
H ₂ SO ₄ Sulfuric Acid	
HCl	Sigma Aldrich
K ₂ HPO ₄ Potassium hydrogen phosphate	Sigma Aldrich
K ₃ Fe(CN) ₆ Potassium Ferricyanide	Sigma Aldrich
K ₄ Fe(CN) ₆ Potassium Ferrocyanide	Sigma Aldrich
KCl Potassium Chloride	Sigma Aldrich
KH ₂ PO ₄ Potassium dihydrogen phosphate	Sigma Aldrich
Mercaptohexanol	Sigma Aldrich
MgCl ₂ (Magnesium Chloride)	
mPEG(O-(2-Mercaptoethyl)-O'-methyl-hexa(ethylene glycol))	Sigma Aldrich
NaCl (Sodium Chloride)	Sigma Aldrich
Nafion	Sigma Aldrich
NaNO ₂ Sodium Nitrite	Sigma Aldrich
NaOH Sodium Hydroxide (pellets)	
Phosmet	Sigma Aldrich
Sodium Acetate	Sigma Aldrich
TCEP (tris(2-carboxyethyl)phosphine)	Sigma Aldrich
Tris (Trizma Base)	Sigma Aldrich
Tween 20	Sigma Aldrich
Αιθανόλη 100%	Sigma Aldrich
Ακετόνη	Sigma Aldrich
Ακετονιτρίλιο (ACN)	Sigma Aldrich
Ακετυλοθειοχολίνη (Acetylthiocholine Iodide)	Sigma Aldrich
Ακετυλοθειοχολίνη (Acetylthiocholine Chloride)	Sigma Aldrich
Ακετυλοχολινεστεράση από ηλεκτροφόρο χέλι (ee-AChE)	Sigma Aldrich
Επτάνιο	

Πίνακας 5: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

5.1 Χρωματομετρία

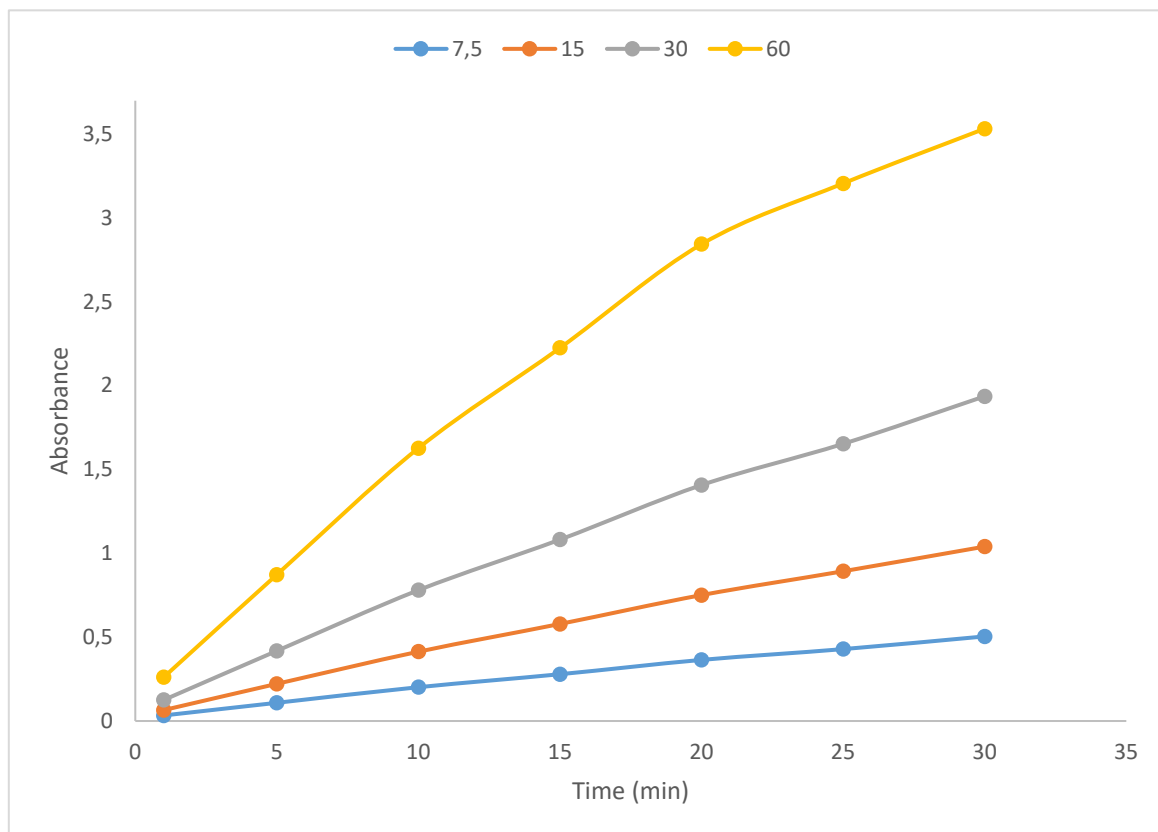
Όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενη υποενότητα, η χρωματομετρία (colorimetry) χρησιμοποιείται για τον έλεγχο με οπτικό τρόπο της δραστηρότητας του ενζύμου καθώς καταλύει την αντίδραση της υδρόλυσης της ακετυλοθειοχολίνης προς θειοχολίνη και οξικό οξύ. Ο έλεγχος αυτός επιτυγχάνεται με τη βοήθεια της χημικής ένωσης DTNB (αντιδραστήριο Ellman's ή 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid)), η οποία αλληλεπιδρά με ομάδεςθειόλης, όπως η ακετυλοθειοχολίνη και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε διαλύματα με ουδέτερο pH. Τα προϊόντα που προκύπτουν από αυτή τη χημική αντίδραση προσδίδουν στο διάλυμα ένα κίτρινο χρώμα και ο προσδιορισμός της έντασής του επιτυγχάνεται με φασματοφωτομέτρηση στα 412 nm.

Όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή της απορρόφησης, τόσο πιο έντονο είναι το κίτρινο χρώμα στο προκύπτον διάλυμα, επομένως τόσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση της θειοχολίνης σε αυτό. (Εικόνα 30) Κατ' επέκταση, όταν το ένζυμο της ακετυλοχολινεστεράσης καταστέλλεται παρουσία των οργανοφωσφορικών ενώσεων, η παραγωγή θειοχολίνης περιορίζεται σημαντικά κι εξαρτάται από το ποσοστό του ελεύθερου ενζύμου που βρίσκεται στο διάλυμα.

Στα πλαίσια της παρούσης εργασίας, σε πρώτο στάδιο εξετάστηκε η σχέση μεταξύ των συγκεντρώσεων του ενζύμου από ηλεκτροφόρο χέλι και του υποστρώματος σε διάφορους χρόνους, με βάση τη βιβλιογραφία. Στόχο αυτής της μελέτης, αποτέλεσε η εξακρίβωση της βέλτιστης συγκέντρωσης ενζύμου- υποστρώματος για την ανίχνευση της μέγιστης δυνατής συγκέντρωσης παραγόμενης θειοχολίνης με οπτικό τρόπο. Έτσι, διατηρώντας τη συγκέντρωση του υποστρώματος σταθερή στο 1 mM, μεταβλήθηκε η συγκέντρωση του ενζύμου στα 7.5, 15, 30 και 60 Units/ mL και η απορρόφηση μετρήθηκε στα 1, 5, 10, 15, 20, 25 και 30 λεπτά.

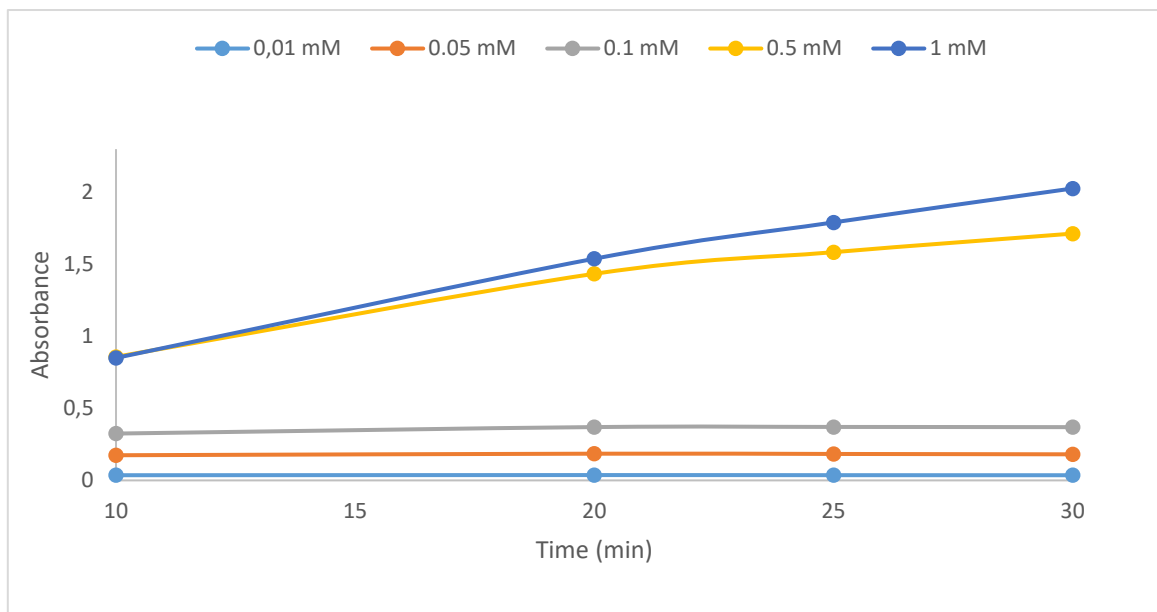
Τόσο το ένζυμο όσο και το υπόστρωμα, ήταν διαλυμένα σε 0,1 M Phosphate Buffer με pH 7. Η συγκέντρωση του DTNB, με βάση τη βιβλιογραφία, ήταν 2 mM σε 0,1 M Phosphate Buffer με pH 7. Σε 96-well microplate Flat Transparent της εταιρίας Greiner Bio-One, τοποθετήθηκαν από κάθε συνδυασμό ενζύμου-υποστρώματος, 100 μ L in triplicate και μετρήθηκε η απορρόφηση στα 2, 5, 10 και 15 λεπτά με τη βοήθεια του

φασματοφωτομέτρου THE SPARK® MULTIMODE MICROPLATE READER της εταιρίας TECAN. Στο παρακάτω Γράφημα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα.



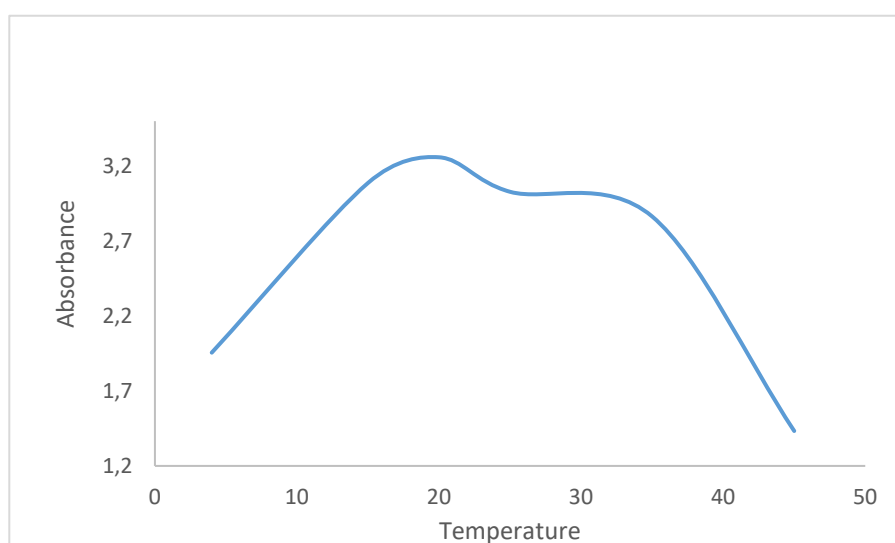
Γράφημα 1: Μέτρηση απορρόφησης συναρτήσει του χρόνου για 7.5, 15, 30 και 60 Units/ mL ενζύμου και 1 mM υποστρώματος, στα 412 nm

Από το Γράφημα 1, παρατηρείται σχεδόν διπλασιασμός των τιμών της απορρόφησης όσο διπλασιάζεται η συγκέντρωση του ενζύμου. Όμως, σε αντίθεση με τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις ενζύμου, στα 60 Units/ mL, ο ρυθμός αύξησης έχει αρχίσει να μειώνεται. Ακόμα το υπόστρωμα δεν έχει κορεστεί, καθώς οι τιμές της απορρόφησης στο πέρασμα του χρόνου συνεχίζουν να αυξάνουν αντί να φτάνουν σε πλατό. Γι' αυτό το λόγο, το επόμενο βήμα ήταν η μείωση της συγκέντρωσης του υποστρώματος. Πιο συγκεκριμένα, για 60 Units/ mL ενζύμου, μελετήθηκαν οι εξής συγκεντρώσεις υποστρώματος: 1mM, 0.5 mM, 0.1 mM, 0.05 mM και 0.01 mM. Οι χρόνοι που μετρήθηκε η απορρόφηση ήταν τα 10, 20, 25 και 30 λεπτά. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Γράφημα 2.



Γράφημα 2: Μέτρηση απορρόφησης συναρτήσει του χρόνου για διάφορες συγκεντρώσεις υποστρώματος με 60 Units/mL ενζύμου, στα 412 nm.

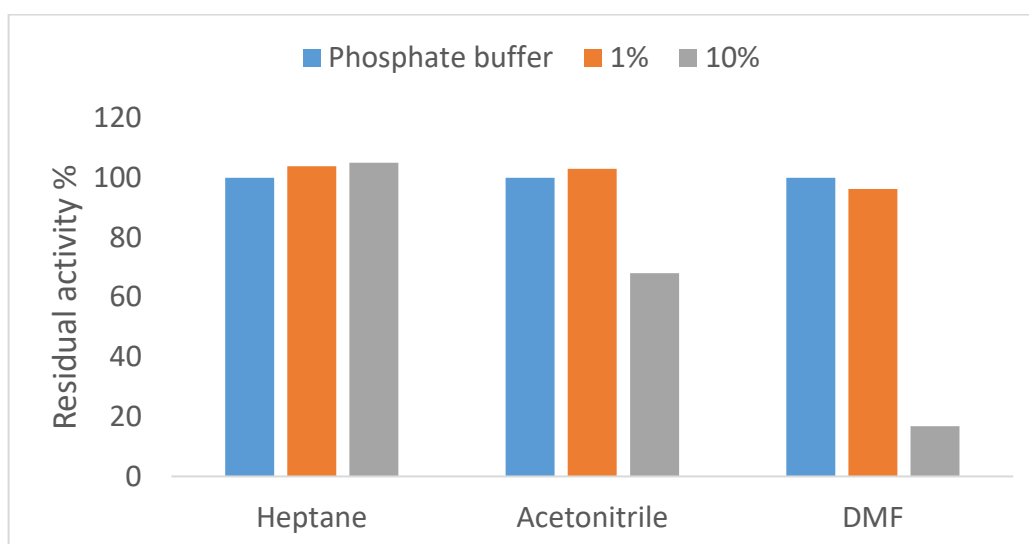
Στις χαμηλές συγκεντρώσεις των 0.01, 0.05 και 0.1 mM υποστρώματος με τη συγκεκριμένη ποσότητα ενζύμου, παρατηρείται τόσο κορεσμός του υποστρώματος, όσο και συνολικά χαμηλές τιμές της απορρόφησης. Επομένως, οι συγκεντρώσεις 0.05 και 1 mM είναι πιο ιδανικές για μετρήσεις χρωματομετρίας. Μια ακόμη παράμετρος που εξετάστηκε ήταν η ιδανική θερμοκρασία λειτουργίας του ενζύμου από ηλεκτροφόρο χέλι.



Γράφημα 3: Μέτρηση απορρόφησης συναρτήσει της θερμοκρασίας

Οι θερμοκρασίες που εξετάστηκαν ήταν 4 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C, 35 °C και 45 °C. Σε κάθε θερμοκρασία τοποθετήθηκαν το διάλυμα του ενζύμου, του υποστρώματος και του DTNB για 30 λεπτά πριν αναμειχθούν για να βρίσκονται στην ίδια θερμοκρασία κατά την ανάμειξή τους. Αφού αναμείχθηκαν, αφέθηκαν στην αντίστοιχη θερμοκρασία για ακόμη 20 λεπτά και έπειτα τοποθετήθηκαν in triplicate σε 96-well microplate για τη μέτρηση της απορρόφησης στα 412 nm. Όπως φαίνεται στο Γράφημα 3, το ένζυμο δρα πιο αποτελεσματικά κοντά στους 20 °C, δίνοντας τη μέγιστη τιμή απορρόφησης.

Μια εξίσου σημαντική παράμετρο αποτελεί η επίδραση των οργανικών διαλυτών στη δραστηριότητα του ενζύμου, καθώς είναι απαραίτητοι για τη διάλυση των φυτοφαρμάκων στο τελικό στάδιο του πειράματος που αφορά την ανίχνευση. Με βάση τη βιβλιογραφία, μελετήθηκε η επίδραση του ακετονιτριλίου, του επτανίου και του DMF, σε ποσοστά 1% και 10%. (53) (54)



Γράφημα 4: Επίδραση διαφορετικών οργανικών διαλυτών στη δραστηριότητα του ενζύμου

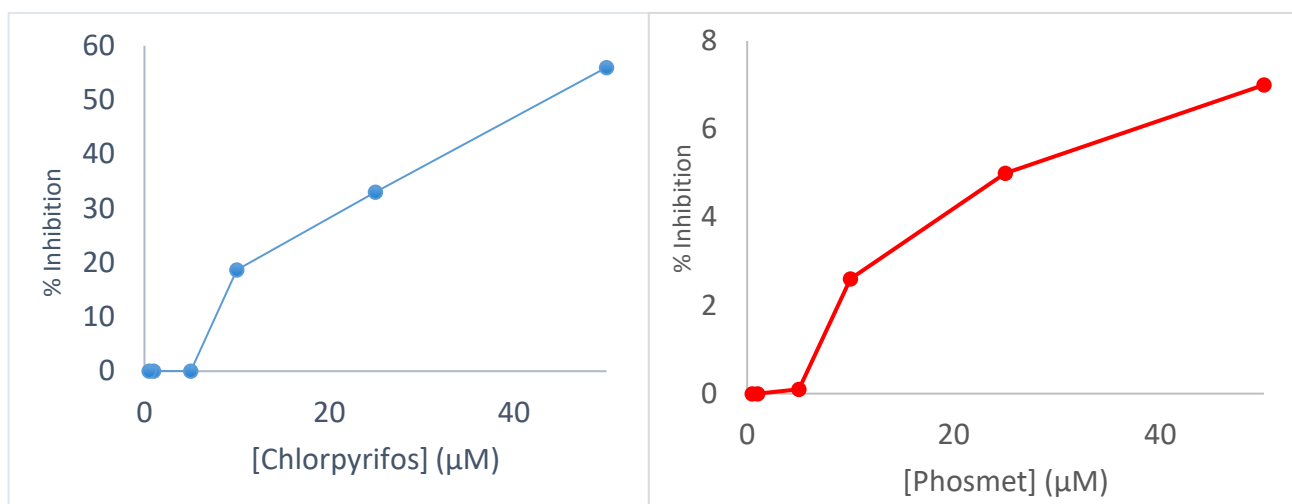
Αρχικά αναμείχθηκε το ένζυμο με τις αντίστοιχες ποσότητες οργανικών διαλυτών αλλά και με Phosphate Buffer σαν control. Κατόπιν, τοποθετήθηκε το υπόστρωμα και το DTNB και τα διαλύματα που προέκυψαν επώαστηκαν για 20 λεπτά και ύστερα μετρήθηκε η απορρόφηση στα 412 nm. Από το Γράφημα 4 προκύπτει πως το 10% ακετονιτριλίου όπως και το 10% DMF επιδρούν αρνητικά στη δράση του ενζύμου σε αντίθεση με το 1%.

Στο τελικό στάδιο του πειράματος με χρωματομετρία, εξετάστηκε η επίδραση της συγκέντρωσης τριών φυτοφαρμάκων στη δραστηριότητα του ενζύμου. Πιο συγκεκριμένα,

χρησιμοποιήθηκαν το chlorpyrifos, το phosmet και το carbofuran. Με βάση τη βιβλιογραφία, οι οργανοφωσφορικές ενώσεις (chlorpyrifos και phosmet) προκαλούν μη αναστρέψιμη αναστολή του ενζύμου. Αντίθετα, το carbofuran ως καρβαμική ένωση, προκαλεί αναστρέψιμη αναστολή της ακετυλοχολινεστεράσης και μη ανταγωνιστική ως προς το υπόστρωμα ακετυλοθειοχολίνης. (72)(80)(82)

Το επτάνιο αποδείχθηκε ακατάλληλος διαλύτης για το phosmet, επομένως επιλέχθηκε το ακετονιτρίλιο σε συγκέντρωση 5% και για τα τρία φυτοφάρμακα (Γράφημα 4), λαμβάνοντας υπ' όψιν και τη βιβλιογραφία (53). Η συγκέντρωση του ενζύμου διατηρήθηκε σταθερή στα 60 Units/ mL, του υποστρώματος στο 1 mM. Τα φυτοφάρμακα χρησιμοποιήθηκαν σε συγκεντρώσεις 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} και 10^{-9} mM.

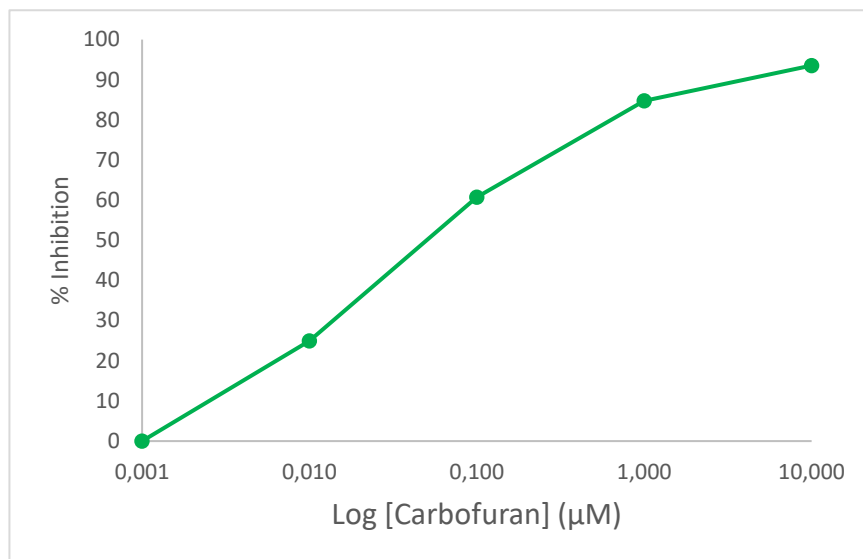
Παρόμοια με το πείραμα στο οποίο εξετάστηκε η επίδραση των οργανικών διαλυτών στη δράση του ενζύμου, το ένζυμο με την κάθε συγκέντρωση φυτοφάρμακου σε 1% ακετονιτρίλιο, αναμείχθηκαν κι αφέθηκαν για επώαση για 20 λεπτά. Έπειτα, προστέθηκε το υπόστρωμα και το DTNB και τα διαλύματα που προέκυψαν επώαστηκαν για ακόμη 20 λεπτά πριν τη μέτρηση της απορρόφησης στα 412 nm.



Γράφημα 5: Επίδραση του Chlorpyrifos και του Phosmet στην AChE

Σύμφωνα με το Γράφημα 5, φαίνεται πως το Chlorpyrifos και το Phosmet δεν προκαλούν μεγάλη αναστολή της ακετυλοχολινεστεράσης, ειδικά στις χαμηλές

συγκεντρώσεις. Εν αντιθέσει, το Carbofuran παρουσίασε διαφορετική συμπεριφορά, πετυχαίνοντας υψηλότερο ποσοστό αναστολής ακόμη και σε χαμηλές συγκεντρώσεις (nM) όπως φαίνεται στο Γράφημα 6.



Γράφημα 6: Επίδραση του Carbofuran στην AChE

5.2 Εισαγωγή στα ηλεκτρόδια χρυσού και άνθρακα

Για τον έλεγχο της καθαρότητας, για ορισμένες τεχνικές τροποποίησης της επιφάνειας των ηλεκτροδίων και γενικότερα για τις ηλεκτροχημικές μετρήσεις χρησιμοποιήθηκαν η κυκλική βολταμετρία (CV), η φασματοσκοπία ηλεκτροχημικής εμπίδησης (PEIS) και η χρονοαμπερομετρία (AMP) με τη βοήθεια του ποτενσιοστάτη/γαλβανοστάτη SP-200 και του λογισμικού EC-LAB της εταιρίας Bio-Logic, Science Instruments.

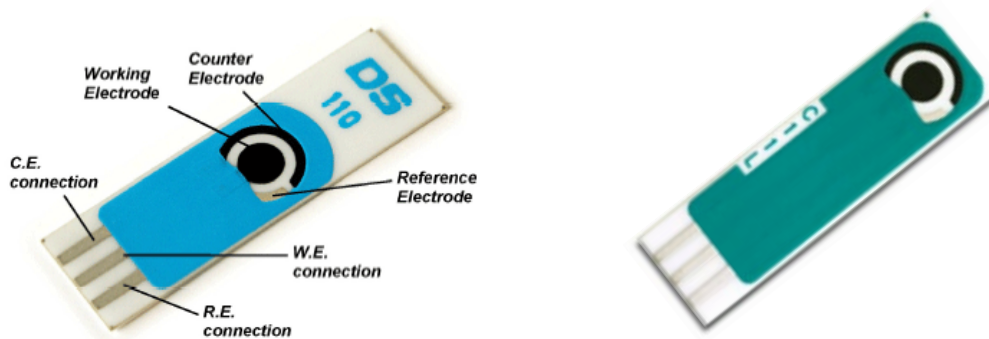
5.2.1 Καθαρισμός ηλεκτροδίων

Στο πρώτο στάδιο πειραμάτων, εξετάστηκε η καθαρότητα των screen printed ηλεκτροδίων χρυσού DRP-C220 BT (Εικόνα 52), της εταιρίας Dropsens με τη βοήθεια της ηλεκτροχημείας. Πιο συγκεκριμένα, αυτό επιτεύχθη αρχικά με την εμβάπτιση του ηλεκτροδίου σε διάλυμα 50 mL 5 mM $K_3Fe(CN)_6 - K_4Fe(CN)_6$ σε 1x PBS.



Εικόνα 52: Το ηλεκτρόδιο χρυσού DRP-C220 BT

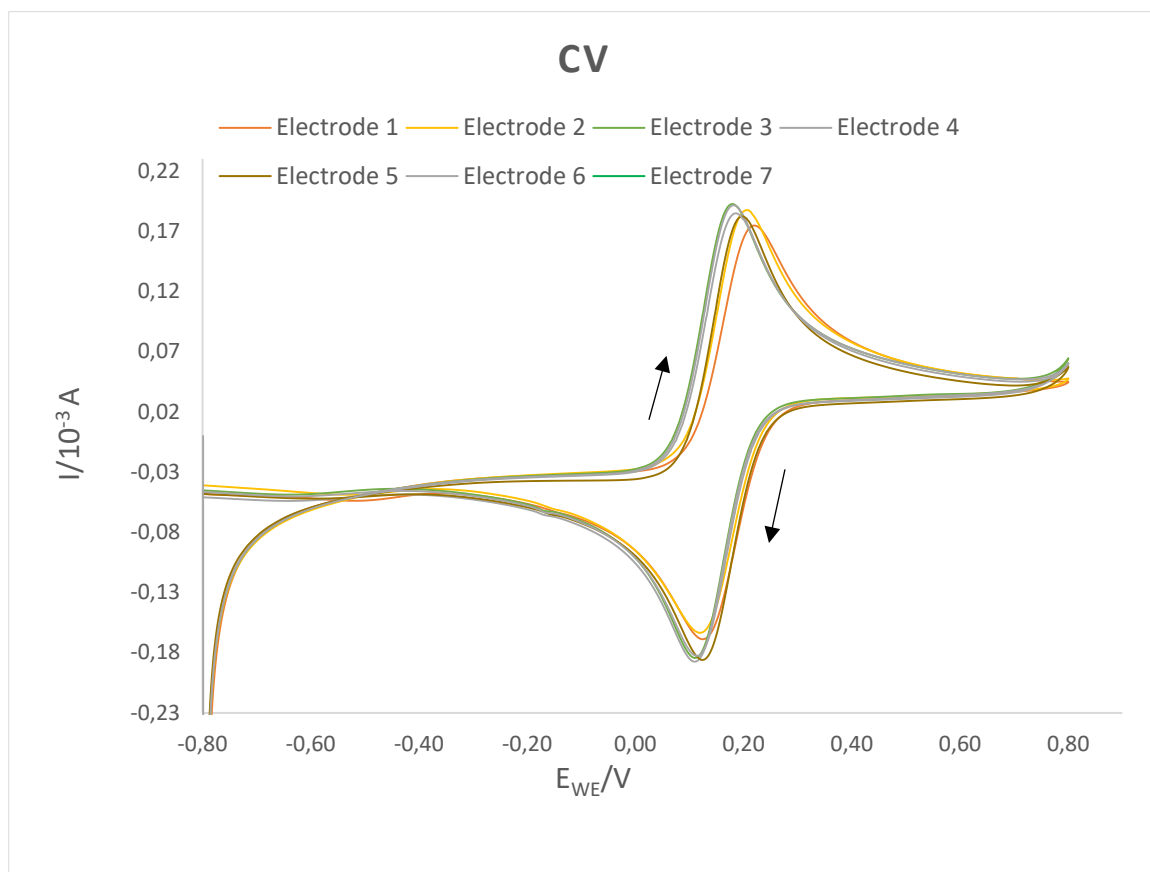
Παράλληλα, χρησιμοποιήθηκαν τα ηλεκτρόδια άνθρακα DRP-110 και τα DRP-C11L, της εταιρίας Dropsens (Εικόνα 53). Η μοναδική διαφορά μεταξύ των δύο αυτών ηλεκτροδίων βρίσκεται στο ηλεκτρόδιο αναφοράς (reference). Στο DRP-110 είναι Ag, ενώ στο DRP-C11L είναι Ag/AgCl. Παρόλα αυτά, δεν παρουσιάζεται κάποια διαφορά στα διαγράμματα κυκλικής βολταμετρίας, μεταξύ των δύο ειδών. Όπως και στα ηλεκτρόδια χρυσού, εξετάστηκε η καθαρότητα των screen printed ηλεκτροδίων άνθρακα με τη βοήθεια της ηλεκτροχημείας. Αυτό επιτεύχθη με την εμβάπτιση του ηλεκτροδίου σε διάλυμα 50 mL 5 mM $K_3Fe(CN)_6$ - $K_4Fe(CN)_6$ σε 1x PBS.



Εικόνα 53: Αριστερά το ηλεκτρόδιο άνθρακα DRP-110, δεξιά το ηλεκτρόδιο άνθρακα DRP-C11L

1. Χαρακτηρισμός πριν τον καθαρισμό ηλεκτροδίων χρυσού

Για τα πρώτα 7 ηλεκτρόδια, αρχικά εφαρμόστηκε κυκλική βολταμετρία στα 20 mV/sec, από [-0.8,0.8] V με το οξειδοαναγωγικό ζεύγος που αναφέρεται παραπάνω.



Γράφημα 7: Αρχικά CVs 7 ηλεκτροδίων χρυσού χαρακτηρισμένων σε 5 mM $K_3Fe(CN)_6 - K_4Fe(CN)_6$ σε 1x PBS με scan rate 20 mV/s

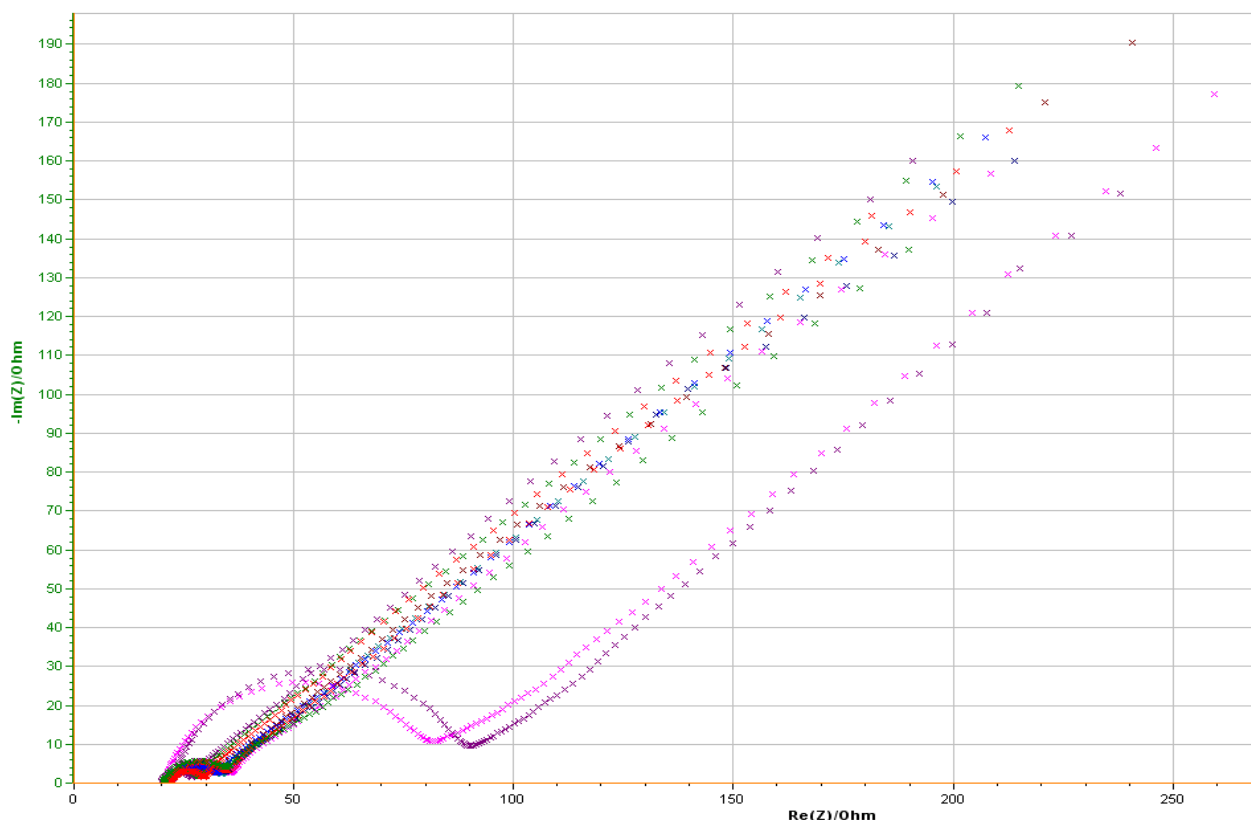
Σύμφωνα με το Γράφημα 7, φαίνονται τα βολταμμογραφήματα (ρεύμα συναρτήσει του δυναμικού) για 7 ίδια ηλεκτρόδια με τις παραμέτρους που αναγράφονται παραπάνω. Το βέλος στην πάνω πλευρά με φορά προς τα δεξιά του γραφήματος υποδηλώνει την οξείδωση, ενώ το βέλος στην κάτω πλευρά με φορά προς τα αριστερά υποδηλώνει την αναγωγή της υπό μελέτη ουσίας πάνω στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Παρά την πανομοιότυπη εκτέλεση της μέτρησης, φαίνεται πως οι επιφάνειες των ηλεκτροδίων δεν είναι εντελώς ίδιες και τα διαγράμματα παρουσιάζουν μερικές διαφορές είτε ως προς το εύρος, είτε ως προς το ύψος των κορυφών.

Έπειτα, θέτοντας τις σωστές παραμέτρους, εφαρμόστηκε με παρόμοιο τρόπο η φασματοσκοπία ηλεκτροχημικής εμέδησης (PEIS). Ύστερα από τις μετρήσεις, το κάθε ηλεκτρόδιο αποσυνδεόταν από την πειραματική διάταξη με τη βοήθεια μεταλλικής λαβίδας, πλενόταν με καθαρό νερό και στέγνωσε με φύσημα με αέριο άζωτο.

Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν αρχικά, με τη βοήθεια του εγχειριδίου του λογισμικού EC-LAB για τη συγκεκριμένη τεχνική, φαίνονται παρακάτω.

Scan from $f_i=1$ MHz to $f_f=100$ mHz,

Logarithmic from f_i to f_f

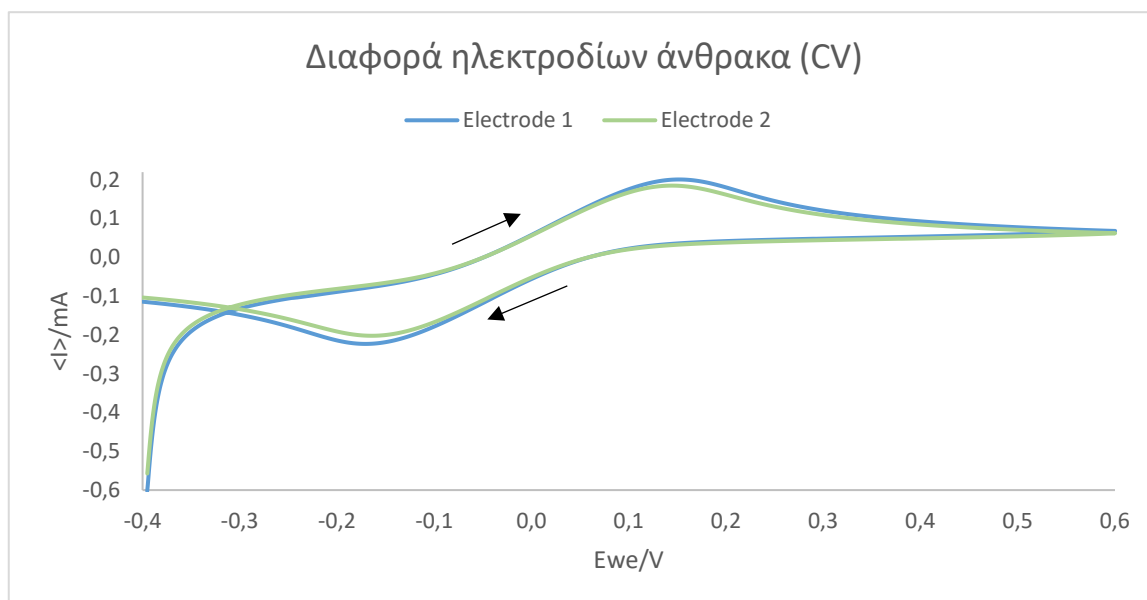


Γράφημα 8 : Διαγράμματα EIS 7 ηλεκτροδίων χρυσού χαρακτηρισμένων σε $5 \text{ mM } K_3Fe(CN)_6 - K_4Fe(CN)_6$ σε $1x \text{ PBS}$

Από το Γράφημα 8, φαίνεται πως τα περισσότερα από τα 7 ηλεκτρόδια παρουσιάζουν παραπλήσια συμπεριφορά, παρ' όλα αυτά υπάρχουν 2 με μεγαλύτερη καμπύλη. Η συμπεριφορά αυτή υποδηλώνει την ύπαρξη ατελειών ή ακαθαρσιών στην επιφάνεια εργασίας των ηλεκτροδίων. Σε αντίθεση με το Γράφημα 7, εδώ φαίνονται πιο εύκολα οι διαφορές στα διαγράμματα, λόγω της ευαισθησίας της μεθόδου. Έτσι, προκύπτει το συμπέρασμα ότι η κυκλική βολταμετρία χρησιμοποιείται για μια πρώτη εκτίμηση της επιφάνειας του ηλεκτροδίου, αλλά κατόπιν κρίνεται αναγκαία η χρήση της φασματοσκοπίας εμπέδησης παρέχοντας περισσότερες πληροφορίες.

2. Χαρακτηρισμός πριν τον καθαρισμό ηλεκτροδίων

Ελέγχθηκαν 2 ηλεκτρόδια, με εφαρμογή κυκλικής βολταμετρίας (CV) και εμπέδησης (PEIS) με το οξειδοαναγωγικό ζεύγος που αναφέρεται παραπάνω.

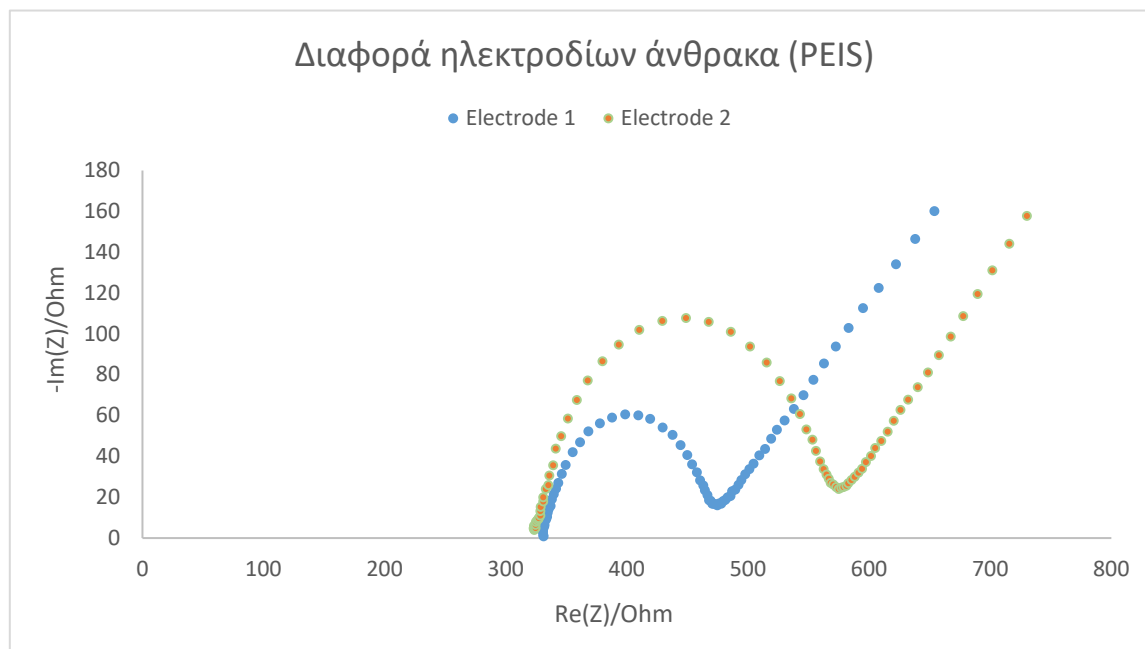


Γράφημα 9: Αρχικά CVs 2 ηλεκτροδίων άνθρακα χαρακτηρισμένων σε 5 mM $K_3Fe(CN)_6 - K_4Fe(CN)_6$ σε 1x PBS με scan rate 50 mV/s

Σύμφωνα με το Γράφημα 9, τα αρχικά βολταμμογραφήματα των δύο ηλεκτροδίων παρουσιάζουν παρόμοια συμπεριφορά, σε αντίθεση με τα αρχικά CVs των ηλεκτροδίων χρυσού. Το βέλος στην πάνω πλευρά με φορά προς τα δεξιά του γραφήματος υποδηλώνει την οξείδωση, ενώ το βέλος στην κάτω πλευρά με φορά προς τα αριστερά υποδηλώνει την αναγωγή της υπό μελέτη ουσίας πάνω στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Από τις χαμηλού σήματος και αρκετά απομακρυσμένες οξειδοαναγωγικές κορυφές φαίνεται πως η επιφάνεια είναι λιγότερο αγωγίμη από αυτή του χρυσού.

Έπειτα, θέτοντας τις σωστές παραμέτρους, εφαρμόστηκε η φασματοσκοπία ηλεκτροχημικής εμπέδησης (PEIS). Παρά την πανομοιότυπη εκτέλεση της μέτρησης, φαίνεται πως οι επιφάνειες των ηλεκτροδίων δεν είναι εντελώς ίδιες παρόλο που τα CVs είναι παρόμοια. Τα διαγράμματα παρουσιάζουν διαφορά ως προς το εύρος και το ύψος της κορυφής, διατηρώντας όμως την ίδια συμπεριφορά. Ύστερα από τις μετρήσεις, το κάθε

ηλεκτρόδιο αποσυνδεόταν από την πειραματική διάταξη με τη βοήθεια μεταλλικής λαβίδας, πλενόταν με καθαρό νερό και στέγνωνε με φύσημα με αέριο άζωτο.



Γράφημα 10: Αρχικά διαγράμματα εμπέδησης 2 ηλεκτροδίων άνθρακα χαρακτηρισμένων σε 5 mM $K_3Fe(CN)_6 - K_4Fe(CN)_6$ σε 1x PBS

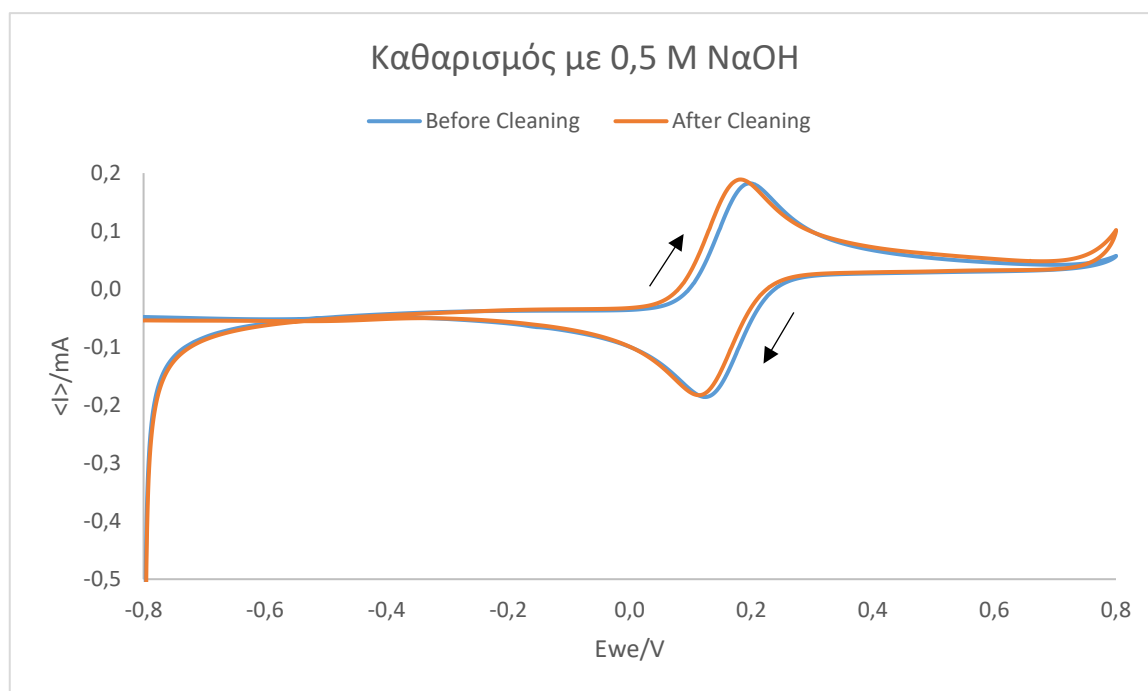
Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν με τη βοήθεια του εγχειριδίου του λογισμικού EC-LAB για τις δυο συγκεκριμένες τεχνικές είναι ίδιες με αυτές που εκτελέστηκαν και στα ηλεκτρόδια χρυσού.

3. Καθαρισμός ηλεκτροδίων χρυσού

Το γεγονός ότι τόσο στο Γράφημα 7, όσο και στο Γράφημα 8 υπάρχουν διαφορές μεταξύ των φαινομενικά ίδιων ηλεκτροδίων, οδηγεί στην ανάγκη καθαρισμού των επιφανειών με διάφορες τεχνικές, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία. Ο καθαρισμός της επιφάνειας θα έχει ως αποτέλεσμα την επιτυχέστερη τροποποίησή της, την αναπαραγωγισιμότητα της μεθόδου καθώς και την ελαχιστοποίηση των σφαλμάτων κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων.

Σαν πρώτη τεχνική, χρησιμοποιήθηκε η εμβάπτιση ενός ηλεκτροδίου σε ακετόνη για 5 λεπτά μέσα σε υπερήχους. Η τεχνική αυτή αποδείχθηκε πλήρως καταστροφική για την επιφάνεια του ηλεκτροδίου, καθώς η περιοχή εργασίας, η περιοχή αναφοράς και η βοηθητική περιοχή έπεσαν με τη μορφή ιζήματος στο διάλυμα της ακετόνης. Επιπλέον, δοκιμάστηκε ο καθαρισμός των ηλεκτροδίων τόσο με εμβάπτιση σε αιθανόλη όσο και λουτρό υπερήχων, όσο και με εμβάπτιση σε αποσταγμένο νερό και λουτρό υπερήχων. Παρόλα αυτά, καμία από τις παραπάνω τεχνικές δεν βελτίωσε τα διαγράμματα CV, επομένως δεν επιτεύχθη ο καθαρισμός των ηλεκτροδίων χρυσού.

Έπειτα, το επόμενο ηλεκτρόδιο εμβαπτίστηκε σε διάλυμα 0.5 M NaOH για την εφαρμογή κυκλικής βολταμετρίας 500 κύκλων περίπου με scan rate 2 V/sec, από -0.35 έως 1.35 V. (57)

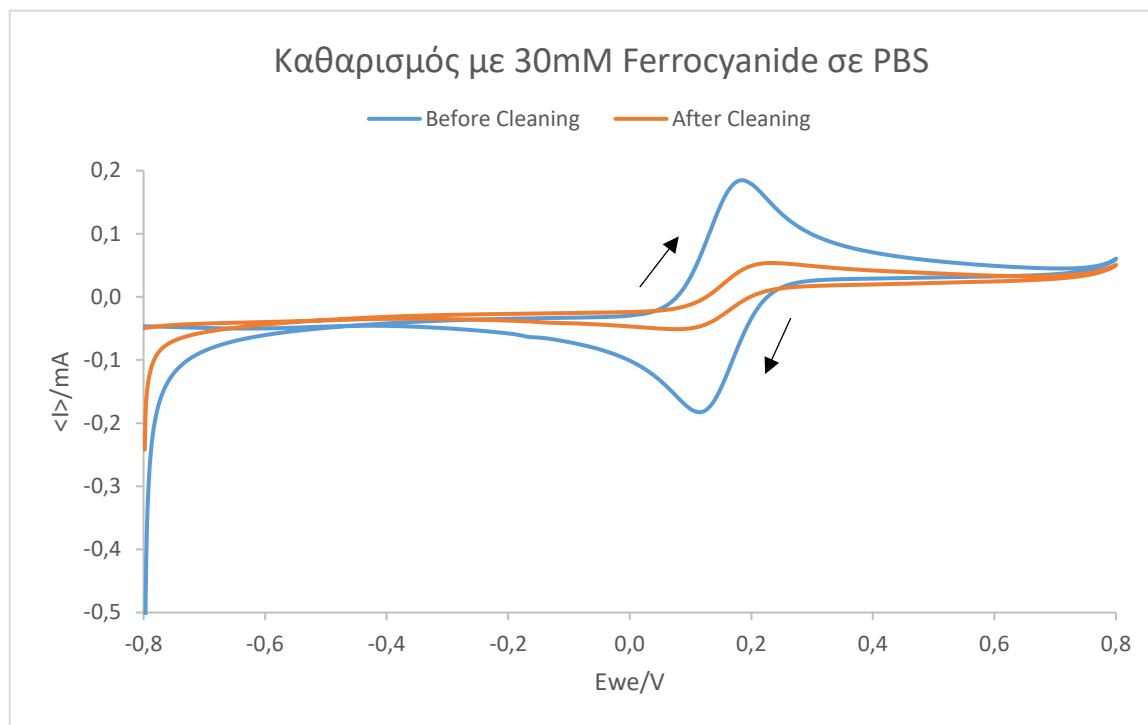


Γράφημα 11: CV για πριν και μετά τον καθαρισμό ηλεκτροδίου με 0,5M NaOH, χαρακτηρισμός σε 5 mM $K_3Fe(CN)_6 - K_4Fe(CN)_6$ σε 1x PBS με scan rate 50 mV/s

Όπως φαίνεται στο Γράφημα 11, το αποτέλεσμα μετά τον καθαρισμό είναι καλύτερο συγκριτικά με του ακαθάριστου ηλεκτροδίου. Υπολογίζοντας το ΔE_p , προκύπτει ότι από 73 mV (μπλε γράφημα πριν τον καθαρισμό) βελτιώθηκε στα 68 mV (πορτοκαλί γράφημα

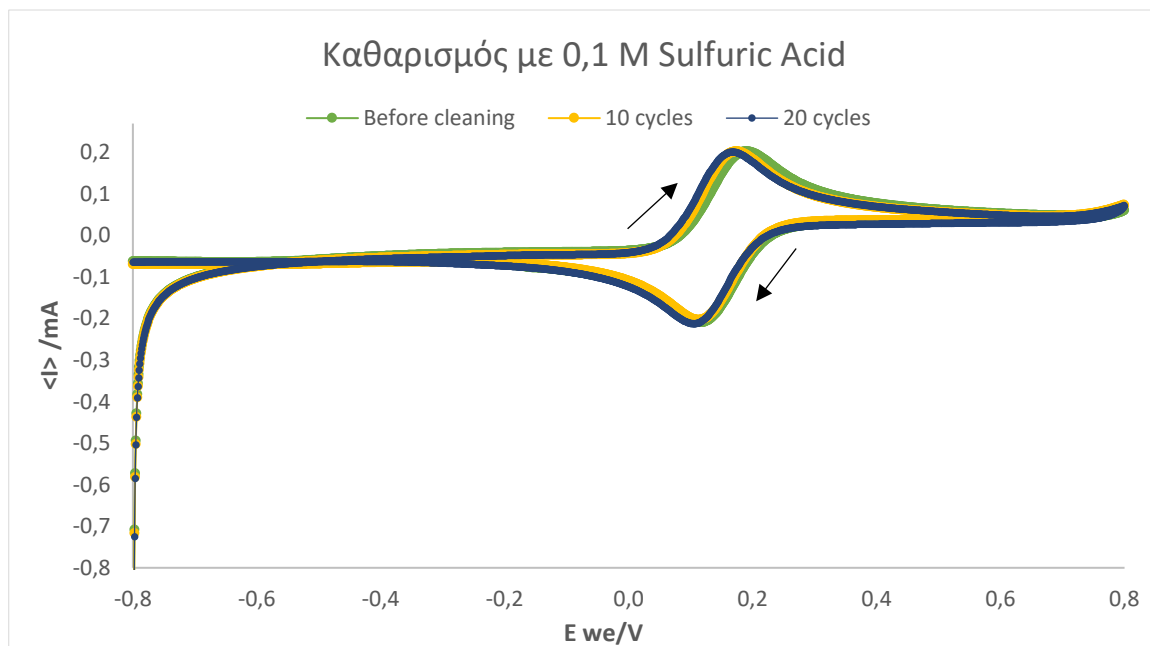
μετά τον καθαρισμό). Παρόλα αυτά, ακολούθησαν και άλλες τεχνικές καθαρισμού με στόχο την προσπάθεια επίτευξης ακόμα μικρότερου ΔE_p .

Έτσι, ακόμη ένα ηλεκτρόδιο εμβαπτίστηκε σε 50 mL διάλυμα 30mM ferrocyanide σε 1x PBS για 50 κύκλους με scan rate 100 mV/sec, από -1 έως 1.2 V. Με τη συγκεκριμένη τεχνική παρατηρήθηκε φθορά της επιφάνειας εργασίας του ηλεκτροδίου, καθώς έγινε πιο σκουρόχρωμη. Στο Γράφημα 12 παρουσιάζονται τα CV πριν και μετά τον καθαρισμό.



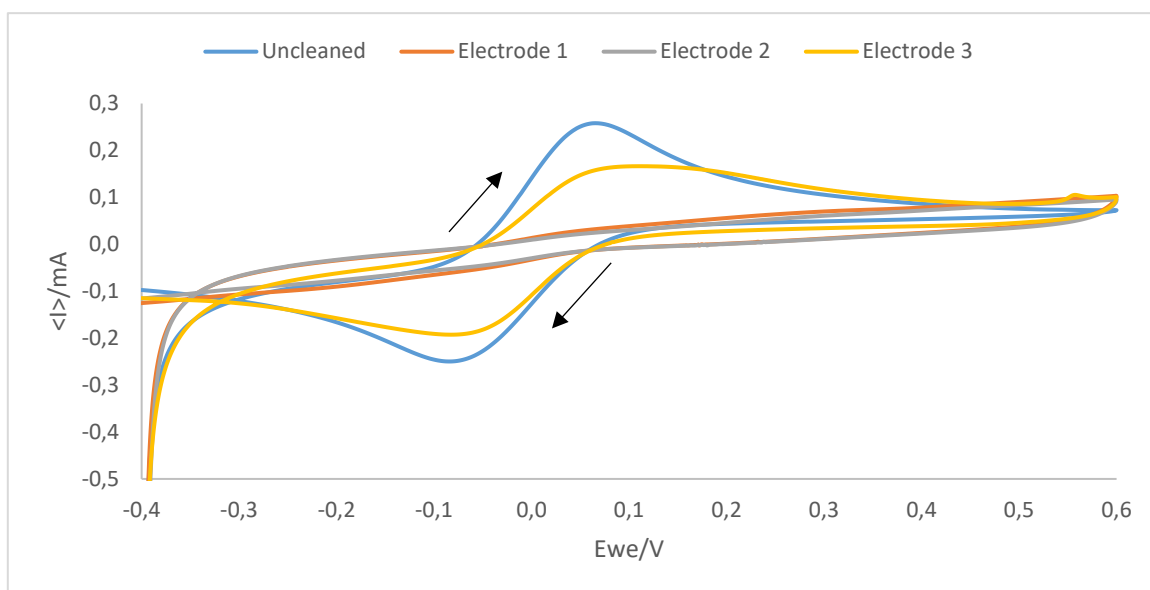
Γράφημα 12: Πριν και μετά τον καθαρισμό ηλεκτροδίου με 30mM Ferrocyanide σε PBS, χαρακτηρισμός σε 5 mM $K_3Fe(CN)_6 - K_4Fe(CN)_6$ σε 1x PBS με scan rate 50 mV/s

Επιπλέον, ένα ηλεκτρόδιο εμβαπτίστηκε σε διάλυμα θειικού οξέως (H_2SO_4) 0.1 M για 10 κύκλους, αρχικά, με scan rate 100 mV/sec, από 0 έως 1.6 V, σύμφωνα με το πρωτόκολλο ηλεκτροχημικού καθαρισμού της Dropsens για το συγκεκριμένο τύπο ηλεκτροδίων. Χαρακτηρίστηκε ως προς το CV και έπειτα, τοποθετήθηκε σε νέο διάλυμα θειικού οξέως (H_2SO_4) 0.1 M για 10 ακόμη κύκλους στις ίδιες συνθήκες. Στο παρακάτω γράφημα παρουσιάζεται το αρχικό CV του ηλεκτροδίου και έπειτα από τους δυο διαδοχικούς καθαρισμούς. Η διαφορά και των τριών διαγραμμάτων είναι σχετικά μικρή και εντοπίζεται κυρίως στην προς τα αριστερά μετατόπιση όσο αυξάνεται ο αριθμός των κύκλων ηλεκτροχημικού καθαρισμού. (53)(57)



Γράφημα 13: CV πριν τον καθαρισμό και μετά από 10 και 20 κύκλους με 0,1 M H_2SO_4 , χαρακτηρισμός σε 5 mM $K_3Fe(CN)_6 - K_4Fe(CN)_6$ σε 1x PBS με scan rate 50 mV/s

Η παραπάνω τεχνική εφαρμόστηκε και σε άλλα ηλεκτρόδια χρυσού για τον έλεγχο της αναπαραγωγιμότητας της μεθόδου. Όμως, παρατηρήθηκε πως αυτή η τεχνική όχι μόνο δεν είναι αναπαραγωγίσιμη, αλλά και σχεδόν καταστρεπτική για κάποια ηλεκτρόδια.



Γράφημα 14: CV 3 ηλεκτροδίων μετά τον καθαρισμό με το πρωτόκολλο της Dropsens, χαρακτηρισμός σε 5 mM $K_3Fe(CN)_6 - K_4Fe(CN)_6$ σε 1x PBS με scan rate 50 mV/s

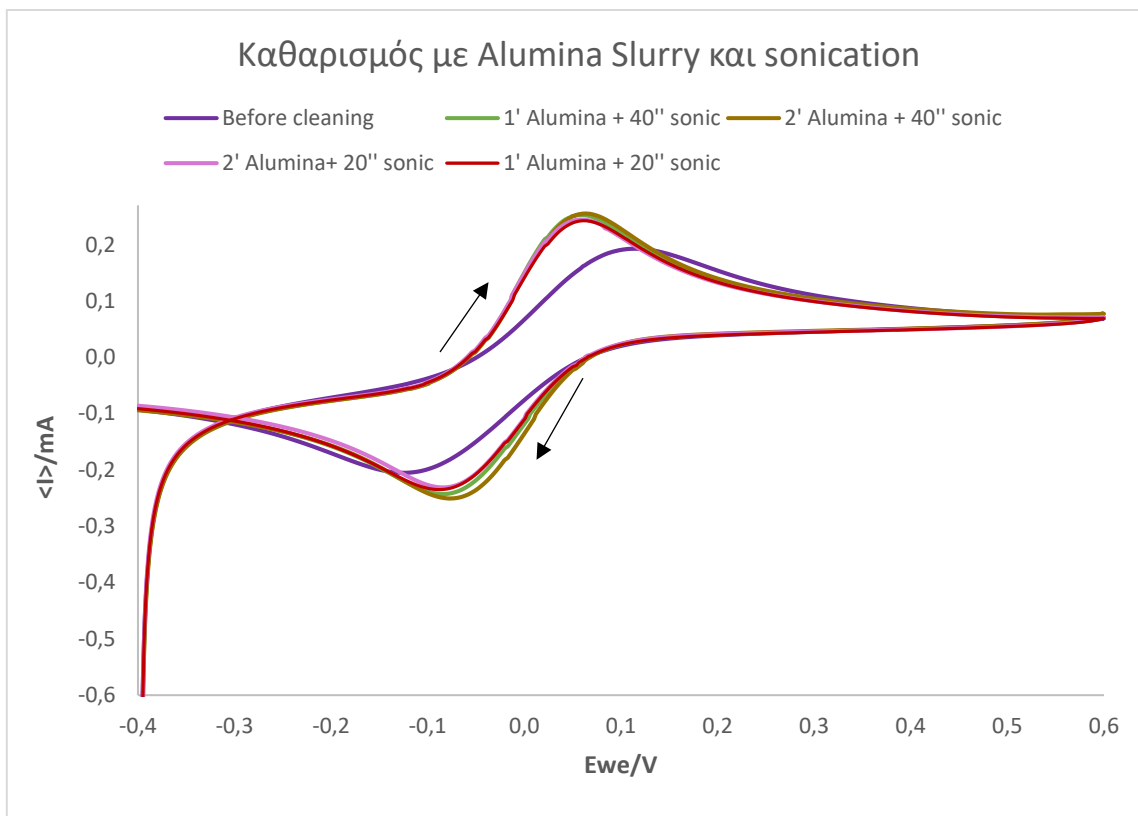
Σύμφωνα με το Γράφημα 14 προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα. Αρχικά, το CV του ακαθάριστου ηλεκτροδίου δίνει ψηλότερο σήμα αλλά και πιο ξεκάθαρες κορυφές σε σχέση με τα ηλεκτρόδια που τροποποιήθηκαν ηλεκτροχημικά με 0,1 M Θειικό οξύ. Επίσης, 2 ηλεκτρόδια έχασαν εξ' ολοκλήρου τις κορυφές οξειδοαναγωγής, το οποίο σημαίνει πως δε μπορούν να χρησιμοποιηθούν περαιτέρω. Επομένως, η τεχνική αυτή δε μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον καθαρισμό των screen printed ηλεκτροδίων χρυσού C220 BT, παρόλο που προτείνεται από την εταιρία Dropsens.

Επίσης, αξίζει να σημειωθεί πως μετά από αυτό το στάδιο, οι περισσότεροι χαρακτηρισμοί έγιναν από [-0.4, 0.6]V με scan rate 50 mV/sec, καθώς παρατηρήθηκε πως το μεγαλύτερο εύρος δυναμικού ταλαιπωρεί ολόκληρη την επιφάνεια του ηλεκτροδίου, χωρίς να παρέχει σημαντικές πληροφορίες για φαινόμενα οξειδοαναγωγής πάνω σε αυτήν.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, αλλά και με βάση την ανάγκη για αυξημένη καθαρότητα των επιφανειών δοκιμάστηκαν δυο ακόμη τεχνικές. Σύμφωνα με την πρώτη, χρησιμοποιήθηκε Alumina slurry 0.3 μm με τη βοήθεια μιας μπατονέτας πάνω στην επιφάνεια και ύστερα εμβάπτιση του ηλεκτροδίου σε καθαρό νερό σε λουτρό υπερήχων (sonication). Ο καθαρισμός διεξήχθη μισό χρόνο στο οριζόντιο επίπεδο και μισό χρόνο στο κάθετο. Οι χρόνοι που ακολουθήθηκαν σύμφωνα με τις αναφορές ήταν οι εξής:

- 1' Alumina slurry + 20'' sonication
- 1' Alumina slurry + 40'' sonication
- 2' Alumina slurry + 20'' sonication
- 2' Alumina slurry + 40'' sonication

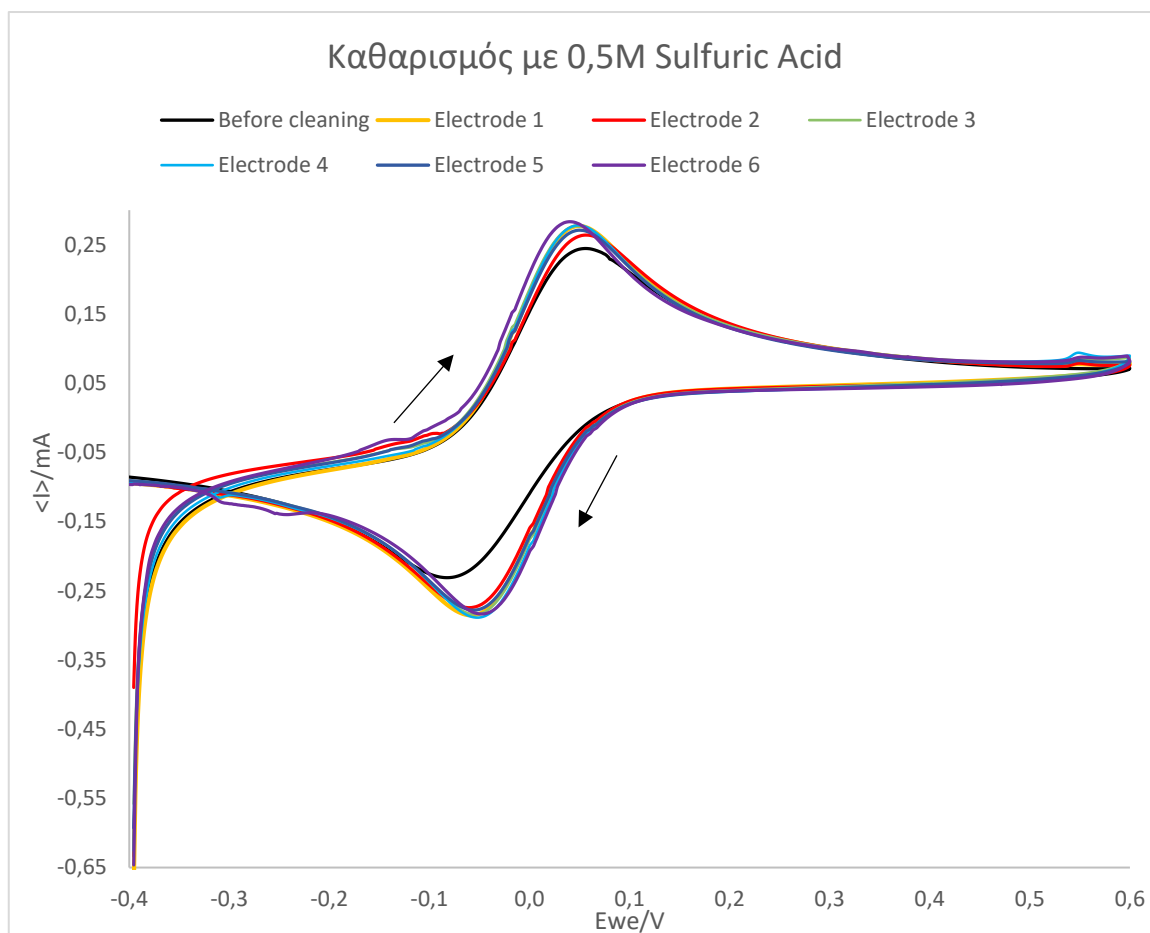
Στο παρακάτω γράφημα, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του χαρακτηρισμού πριν και μετά την επεξεργασία με την Alumina slurry (0.3 μm) και sonication σε διάλυμα 0.1 M 1x PBS με Ferri/Ferrocyanide.



Γράφημα 15: CV πριν και μετά τον καθαρισμό με Alumina slurry και sonication σε διαφορετικούς χρόνους, χαρακτηρισμός σε 5 mM $K_3Fe(CN)_6 - K_4Fe(CN)_6$ σε 1x PBS με scan rate 50 mV/s

Σύμφωνα με το Γράφημα 15, επιλέχθηκε ο καθαρισμός των ηλεκτροδίων για 1' με Alumina slurry και 20'' sonication, που είχε ως αποτέλεσμα τον ικανοποιητικό καθαρισμό και ταυτόχρονα τη λιγότερη καταπόνηση του ηλεκτροδίου. Η συγκεκριμένη μέθοδος, όμως παρουσιάζει ορισμένα μειονεκτήματα. Σημαντικότερα όλων είναι τόσο η αδυναμία ακριβούς επαναληψιμότητας της μεθόδου καθώς πραγματοποιείται με το χέρι, όσο και η εφαρμογή διαφορετικής δύναμης μεταξύ του τριπήματος μεταξύ των διαφορετικών επιπέδων στο κάθε ηλεκτρόδιο.

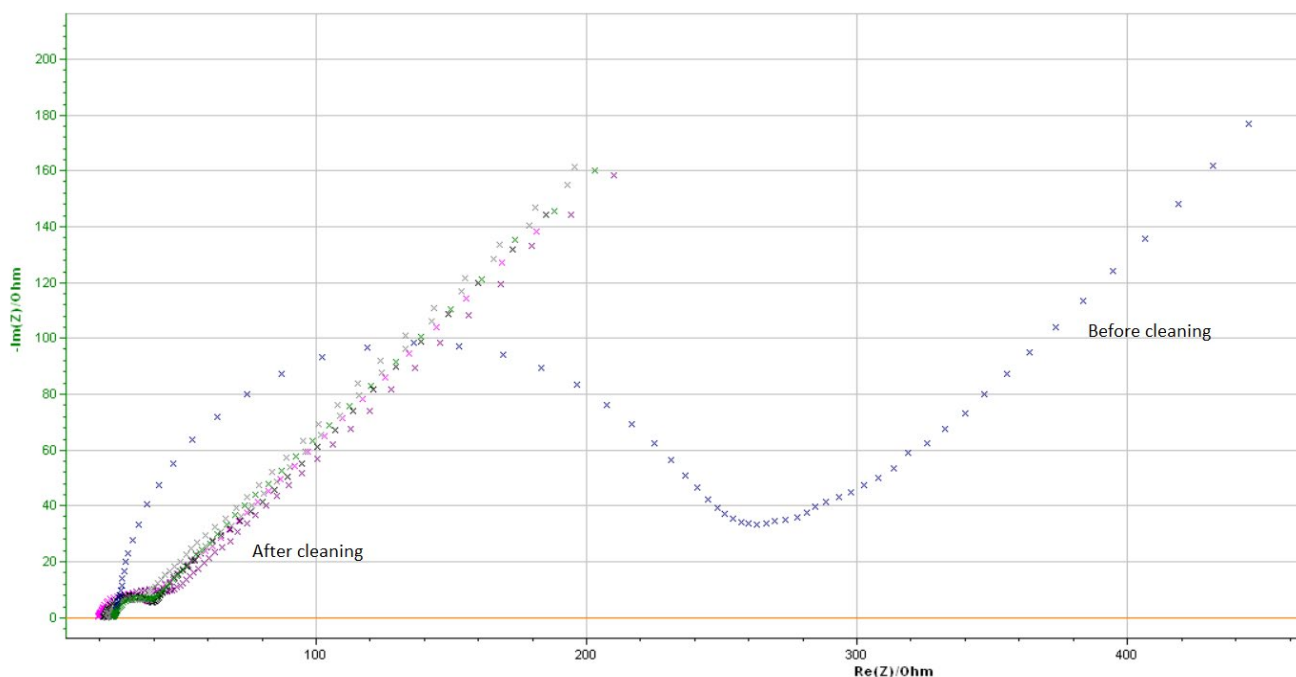
Τα μειονεκτήματα της παραπάνω μεθόδου οδήγησαν σε διάφορες δοκιμές καθαρισμού. Έτσι, η δεύτερη μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε, αξιοποίησε το πρωτόκολλο ηλεκτροχημικού καθαρισμού αλλά σε διαφορετικές συνθήκες κατόπιν εργαστηριακών δοκιμών για τα συγκεκριμένα ηλεκτρόδια. Σύμφωνα με αυτό, 100 μ L σταγόνας 0.1 M H_2SO_4 τοποθετούνται πάνω στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Οι τιμές του δυναμικού είναι πλέον από τις θετικές προς τις αρνητικές [1,-1.5] V, με scan rate 100 mV/sec για 5 κύκλους.



Γράφημα 16: CVs 6 ηλεκτροδίων ύστερα από καθαρισμό με H_2SO_4 , $100mV/s$, 5 cycles, $[1,-1.5]V$, χαρακτηρισμός σε $5 mM K_3Fe(CN)_6 - K_4Fe(CN)_6$ σε $1x PBS$ με scan rate $50 mV/s$

Στο Γράφημα 16 παρουσιάζονται τα CV που προκύπτουν από τον χαρακτηρισμό έπειτα από τον καθαρισμό 6 ηλεκτροδίων με πανομοιότυπο τρόπο. Η μαύρη γραμμή απεικονίζει το σήμα που λαμβάνεται από ένα ηλεκτρόδιο πριν τον καθαρισμό και είναι σαφώς χαμηλότερο σε σχέση με το σήμα που προκύπτει μετέπειτα. Επιπλέον, πολύ σημαντική κρίνεται και η μείωση της απόστασης μεταξύ των κορυφών οξείδωσης και αναγωγής (peak to peak separation) που μεταφράζεται σε καθαρότερη επιφάνεια. Ο χαρακτηρισμός έγινε σε διάλυμα $1x PBS$ με $5 mM$ Ferri/Ferrocyanide.

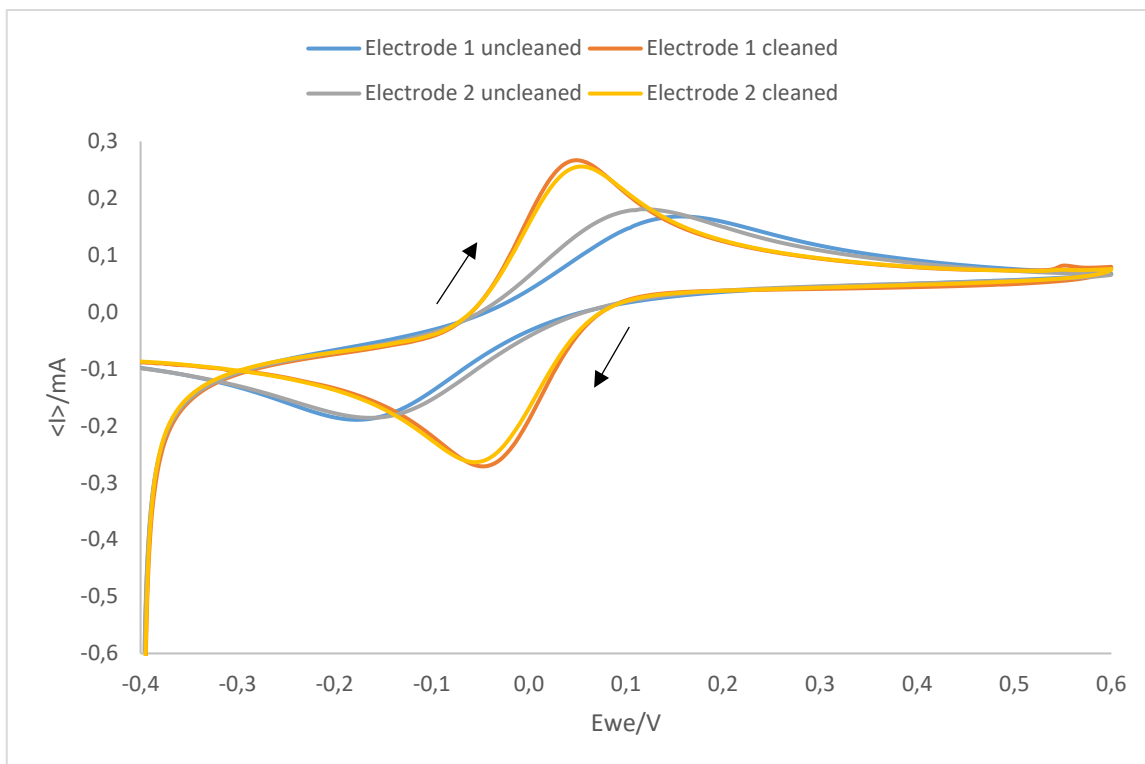
Από τη στιγμή που τα CV έδειξαν βελτιστοποίηση, λήφθηκαν και τα διαγράμματα εμπέδησης (PEIS) όπως φαίνονται παρακάτω.



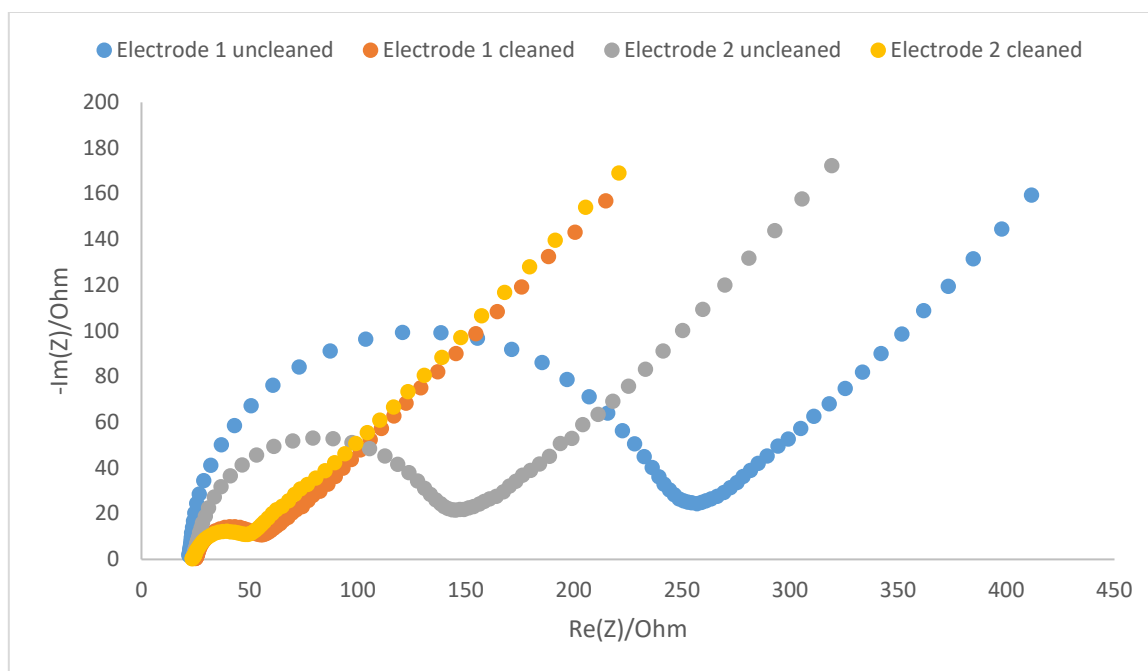
Γράφημα 17: Διαγράμματα Nyquist 6 ηλεκτροδίων μετά τον καθαρισμό με H_2SO_4 , $100mV/s$, 5 cycles, [1,-1.5]V και σύγκριση με πριν τον καθαρισμό, χαρακτηρισμός σε $5 mM K_3Fe(CN)_6 - K_4Fe(CN)_6$ σε $1x PBS$

Ο συγκεκριμένος τρόπος καθαρισμού, όπως φαίνεται από το Γράφημα 16 και το Γράφημα 17, παρέχει αναπαραγωγίσιμα αποτελέσματα. Επίσης, η σημαντική πτώση της αντίστασης μετά τον καθαρισμό των επιφανειών οδήγησε στο να καθιερωθεί αυτός ο τρόπος. Επιπλέον, σε ήδη καθαρισμένο με αυτόν τον τρόπο και χρησιμοποιημένο ηλεκτρόδιο δοκιμάστηκε για δεύτερη φορά καθαρισμός στις ίδιες συνθήκες και έπειτα χαρακτηρισμός ως προς την εμπέδηση. Βέβαια, μετά τις δυο φορές η επιφάνεια του ηλεκτροδίου φθείρεται σημαντικά και το σήμα που λαμβάνεται είναι αρκετά λιγότερο από το επιθυμητό.

Για να είναι πιο ξεκάθαρα τα αποτελέσματα πριν και μετά τον καθαρισμό με αυτήν την τεχνική απομονώθηκαν τα διαγράμματα CV και PEIS 2 ηλεκτροδίων. Στο Γράφημα 18 με μπλε και γκρι χρώμα φαίνονται τα διαγράμματα CV πριν τον καθαρισμό, ενώ με κίτρινο και πορτοκαλί χρώμα τα διαγράμματα CV μετά τον καθαρισμό. Για το ηλεκτρόδιο 1 το ΔE_p από $334,7 mV$ μειώθηκε στα $95,7 mV$ και για το ηλεκτρόδιο 2 το ΔE_p από $280 mV$ μειώθηκε στα $98 mV$. Αντίστοιχα, στο Γράφημα 19, με τα ίδια χρώματα φαίνονται τα διαγράμματα PEIS των 2 ηλεκτροδίων πριν και μετά τον καθαρισμό.



Γράφημα 18: CV διαγράμματα 2 ηλεκτροδίων χρυσού πριν και μετά τον καθαρισμό με 0,5 M Θειικό οξύ, στα 100 mV/s, 5 cycles, χαρακτηρισμός σε 5 mM $K_3Fe(CN)_6 - K_4Fe(CN)_6$ σε 1x PBS με scan rate 50 mV/s

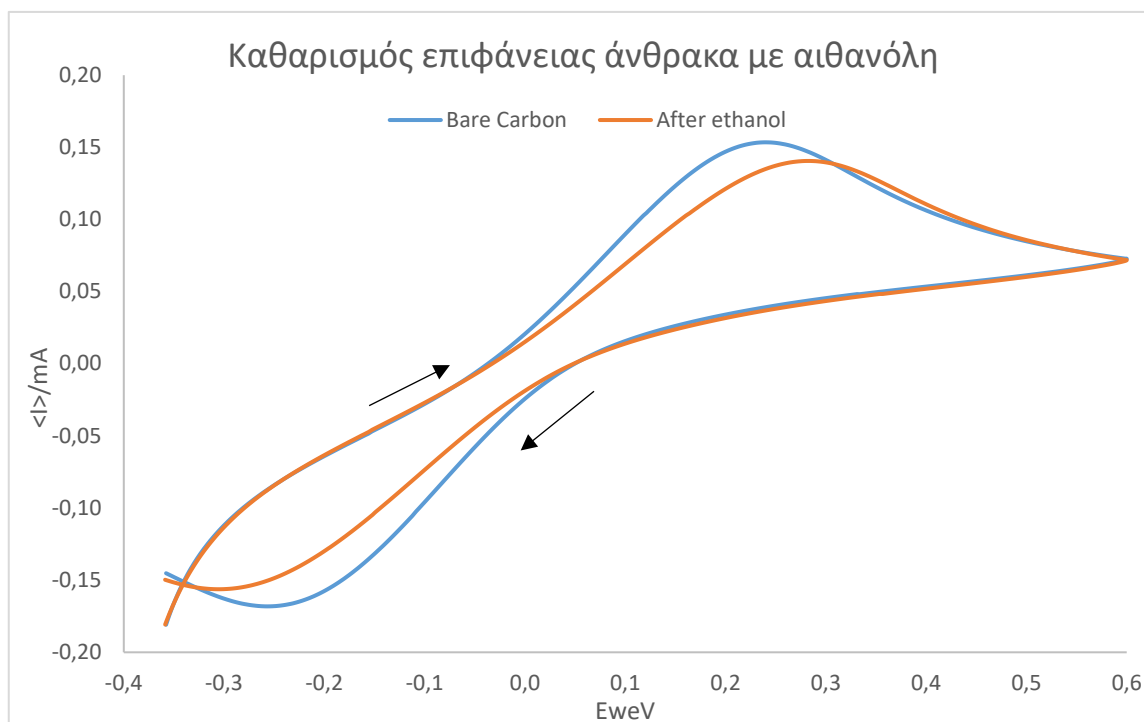


Γράφημα 19: PEIS διαγράμματα 2 ηλεκτροδίων χρυσού πριν και μετά τον καθαρισμό με 0,5 M Θειικό οξύ, στα 100 mV/s, 5 cycles, χαρακτηρισμός σε 5 mM $K_3Fe(CN)_6 - K_4Fe(CN)_6$ σε 1x PBS

4. Καθαρισμός ηλεκτροδίων άνθρακα

Δοκιμάστηκαν κάποιες τεχνικές καθαρισμού και στα ηλεκτροδια DRP-110 με την ίδια λογική όπως στα ηλεκτρόδια χρυσού, παρόλο που βιβλιογραφικά δεν υπάρχει κάποιο πρωτόκολλο καθαρισμού. Έτσι, αρχικά δοκιμάστηκε η εμβάπτιση ενός ηλεκτροδίου σε αιθανόλη για 5 λεπτά και ύστερα 20'' Sonication, φύσημα της επιφάνειας με αέριο άζωτο και έπειτα χαρακτηρισμός ως προς CV από [-0.4,0.6]V σε διάλυμα 5 mM $K_3Fe(CN)_6$ - $K_4Fe(CN)_6$ σε 1x PBS, με 50 mV/s.

Στο Γράφημα 20, φαίνονται τα CV του ηλεκτροδίου πριν και μετά τον καθαρισμό. Το σήμα του γραφήματος μετά τον καθαρισμό είναι πιο χαμηλό σε σχέση με πριν τον καθαρισμό. Επιπλέον, οι οξειδοαναγωγικές κορυφές έχουν λίγο απομακρυνθεί μετά τον καθαρισμό.

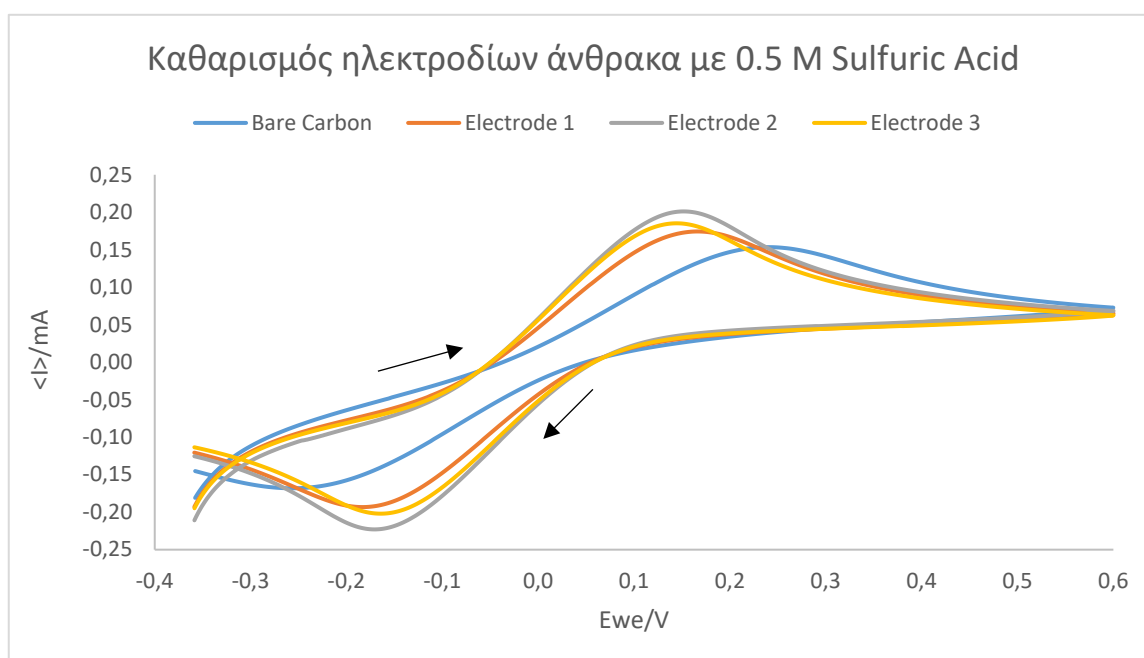


Γράφημα 20: CVs για ηλεκτρόδιο άνθρακα πριν και μετά τον καθαρισμό με αιθανόλη, χαρακτηρισμένο σε 5 mM $K_3Fe(CN)_6$ - $K_4Fe(CN)_6$ σε 1x PBS, με scan rate 50 mV/s

Εφόσον η τεχνική αυτή δεν βελτίωσε το προκύπτον σήμα κρίθηκε ακατάλληλη και δοκιμάστηκε το πρωτόκολλο ηλεκτροχημικού καθαρισμού με 100 μL σταγόνας 0.1 M H_2SO_4 πάνω στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Οι τιμές του δυναμικού κατευθύνονται από τις θετικές προς τις αρνητικές [1,-1.5] V, με scan rate 100 mV/sec για 5 κύκλους. Αυτή η

τεχνική εφαρμόστηκε σε τρία ηλεκτρόδια άνθρακα και έπειτα χαρακτηρίστηκαν εκ νέου με 5 mM $K_3Fe(CN)_6 - K_4Fe(CN)_6$ σε 1x PBS, με 50 mV/s.

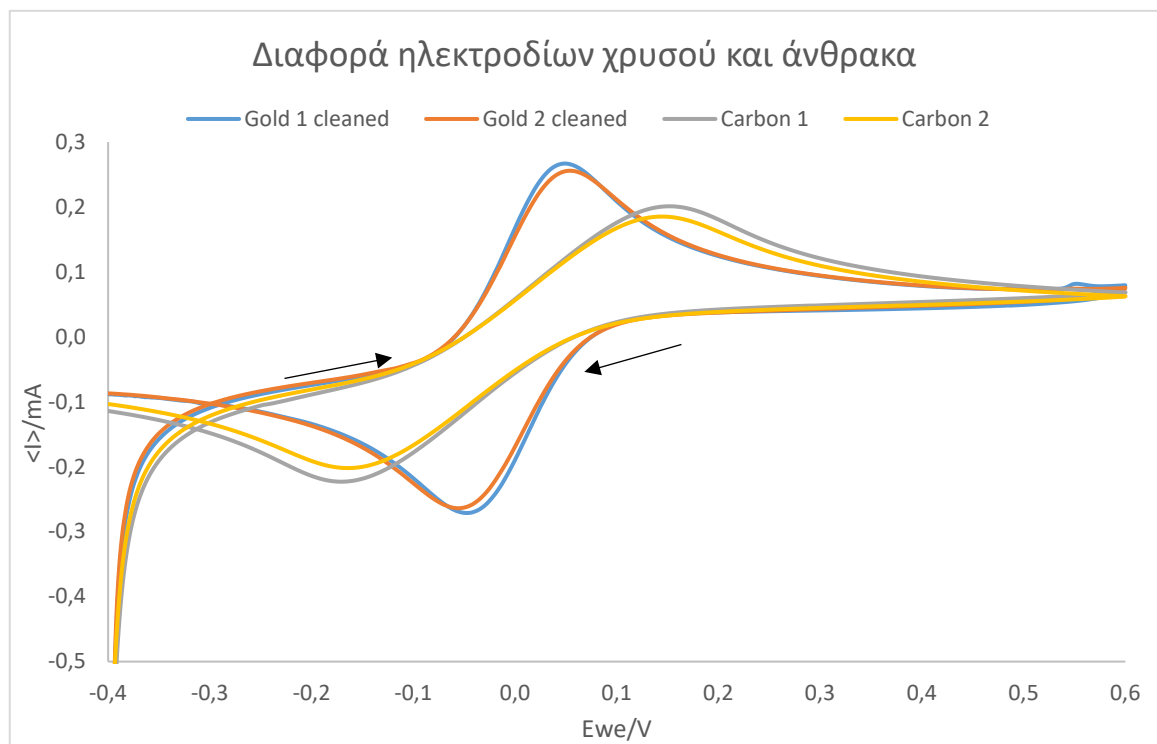
Σε αντίθεση με τα αποτελέσματα του καθαρισμού με αιθανόλη, τα αποτελέσματα του ηλεκτροχημικού καθαρισμού είναι σαφώς βελτιωμένα. Στο Γράφημα 21, τα σήματα και στα τρία ηλεκτρόδια είναι πιο ψηλά από αυτό του ακαθάριστου ηλεκτροδίου, καθώς επίσης μικραίνει και το ΔE_p των οξειδοαναγωγικών κορυφών. Από την άλλη πλευρά το σημαντικό μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι τα αποτελέσματα του καθαρισμού δεν είναι αναπαραγωγίσιμα σε αντίθεση με την ίδια τεχνική σε ηλεκτρόδια χρυσού.



Γράφημα 21: CVs για 3 ηλεκτρόδια άνθρακα πριν και μετά τον καθαρισμό με 0,5 M Θειικό οξύ, στα 100 mV/s, 5 cycles, χαρακτηρισμένα σε 5 mM $K_3Fe(CN)_6 - K_4Fe(CN)_6$ σε 1x PBS, με scan rate 50 mV/s

Επομένως προτιμήθηκε να μην ακολουθείται καμία τεχνική καθαρισμού για τα ηλεκτρόδια άνθρακα, εφόσον ως ακαθάριστα παρουσιάζουν μεγαλύτερη ομοιότητα στα σήματα σε αντίθεση με τα καθαρισμένα.

5. Σύγκριση των ηλεκτροδίων χρυσού και άνθρακα



Γράφημα 22: Διαφορά ηλεκτροδίων χρυσού μετά τον καθαρισμό και άνθρακα χωρίς καθαρισμό, χαρακτηρισμός σε 5 mM $K_3Fe(CN)_6 - K_4Fe(CN)_6$ σε 1x PBS, με scan rate 50 mV/s

Από το Γράφημα 22 προκύπτει πως τα καθαρισμένα ηλεκτρόδια χρυσού αποδίδουν υψηλότερα σήματα σε σχέση με τα ηλεκτρόδια άνθρακα. Επίσης, η διαφορά των οξειδοαναγωγικών κορυφών (ΔE_p) είναι πολύ μεγαλύτερη στον άνθρακα από ότι στο χρυσό. Αυτά οφείλονται στην καλύτερη αγωγιμότητα που παρουσιάζει ο χρυσός έναντι του άνθρακα.

5.2.2 Αρχικές ηλεκτροχημικές μετρήσεις

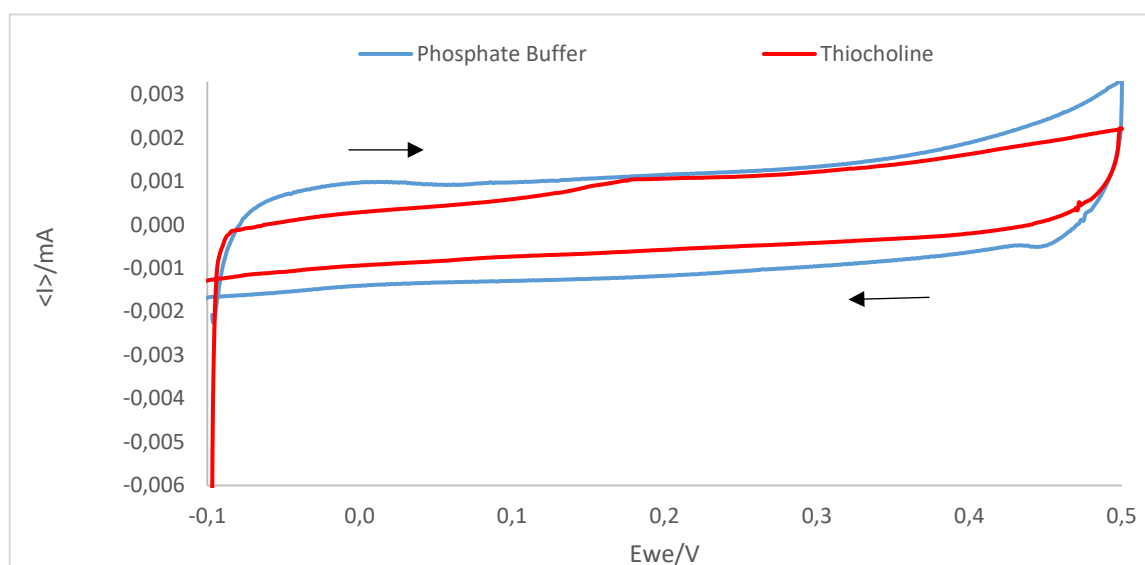
Από τη στιγμή που οι συνθήκες καθαρισμού εδραιώθηκαν και για τους δύο τύπους ηλεκτροδίων, το επόμενο στάδιο του πειράματος ήταν η μέτρηση του ρεύματος δύο σημαντικών ουσιών: του Phosphate Buffer, και της θειοχολίνης (thiocholine) που προέκυψε από το υποστρώμα ακετυλοθειοχολίνης. Για την κατασκευή του Phosphate

Buffer 50 mM με 0,1 M KCl με pH 7,4 απαιτούνται 8,02 mL K₂HPO₄ και 1,98 mL KH₂PO₄ σε 190 mL απεσταγμένου νερού.

Επιπλέον, το υπόστρωμα ακετυλοθειοχολίνης (Acetylthiocholine chloride) φτιάχνεται σε Phosphate Buffer 50 mM με 0,1 M KCl με pH 7,4. Έχουν εξετασθεί διάφορες συγκεντρώσεις, όμως για τη λήψη ενός μεγάλου σήματος χρησιμοποιήθηκε μεγάλη συγκέντρωση υποστρώματος (10 mM).

Τέλος, η θειοχολίνη παράχθηκε ενζυμικά ως εξής: σε 10 mM υποστρώματος ακετυλοθειοχολίνης σε Phosphate Buffer 50 mM με 0,1 M KCl με pH 7,4 τοποθετήθηκαν 60 U/mL (τελική συγκέντρωση) και αφέθηκαν για 2 ώρες στους 20 °C, όπου προέκυψε από τη χρωματομετρία (Γράφημα 3) ότι είναι η βέλτιστη θερμοκρασία για την AChE. Έπειτα, ακολούθησε η μέθοδος της χρωματομετρίας με στόχο τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της παραγόμενης θειοχολίνης με βάση το νόμο Beer-Lambert (Εξίσωση 7), σύμφωνα με τον οποίο προκύπτει:

$$A = \varepsilon * C * l \leftrightarrow C = \frac{A}{\varepsilon * l}, \text{ όπου } \varepsilon = 14 * 10^3 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1} \text{ στους } 20 \text{ }^\circ\text{C}$$



Γράφημα 23: CV για το Phosphate Buffer 50 mM με 0,1 M KCl και 5mM θειοχολίνη με scan rate 50 mV/s σε ηλεκτρόδιο χρυσού

Για να ληφθούν τα βολταμογραφήματα που φαίνονται στο Γράφημα 23, τοποθετήθηκε αρχικά Phosphate Buffer 50 mM με 0,1 M KCl με pH 7,4 και ύστερα το διάλυμα

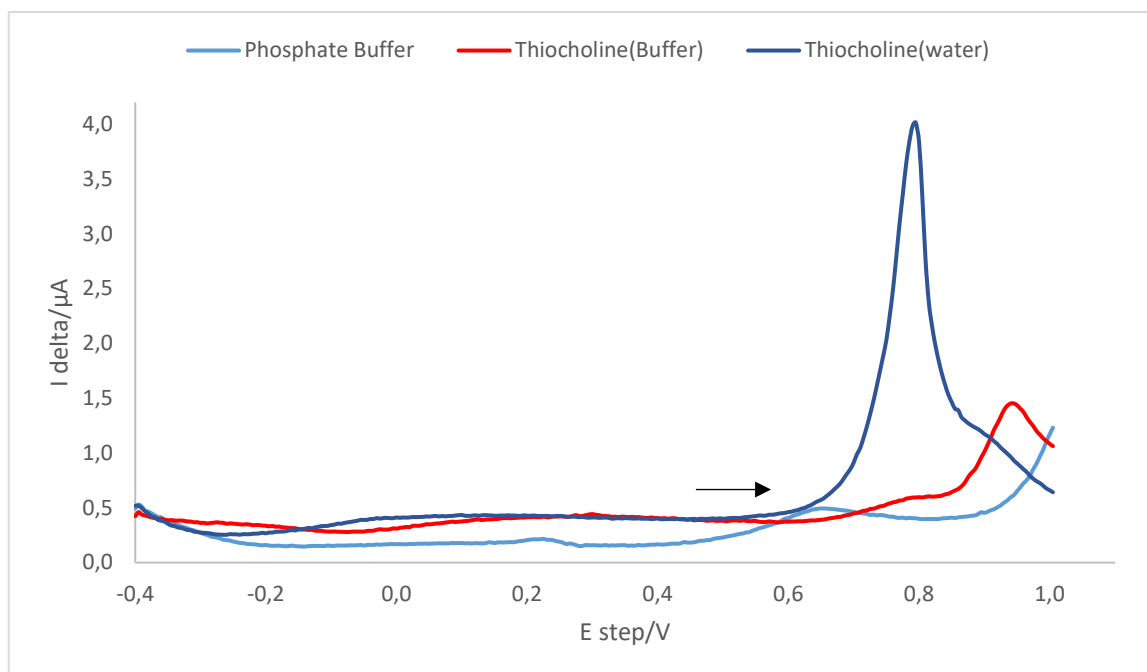
θειοχολίνης (5mM) στην καθαρισμένη επιφάνεια ενός ηλεκτροδίου χρυσού DRP-C220 BT.

Τα ρεύματα που ανιχνεύονται στην ατροποποίητη επιφάνεια του ηλεκτροδίου χρυσού στο παραπάνω γράφημα είναι αρκετά χαμηλά. Το γράφημα της οξειδωσης της θειοχολίνης (κόκκινο χρώμα στο γράφημα 23) έχει ελαφρώς μικρότερο σήμα από το αντίστοιχο γράφημα του Phosphate Buffer και αυτό καθιστά αυτή την ουσία δύσκολα ανιχνεύσιμη. Παρόλα αυτά, παρατηρείται ο σχηματισμός μιας μικρής κορυφής και μια μικρή άνοδος του σήματος της θειοχολίνης (περίπου 1 μA) έναντι του σήματος του υποστρώματος.

Επομένως, σύμφωνα με τα παραπάνω συμπεράσματα, προκύπτει η ανάγκη για την αύξηση της ευαισθησίας του συστήματος. Αυτό μπορεί να προκύψει κυρίως σε δύο στάδια. Το πρώτο στάδιο αφορά τη μελέτη ύπαρξης μιας πιο ευαίσθητης τεχνικής από την Κυκλική Βολταμμετρία και το δεύτερο αφορά την κατάλληλη τροποποίηση της επιφάνειας με στόχο την αύξηση της αγωγιμότητας για τη λήψη υψηλότερων σημάτων.

Με βάση τη βιβλιογραφία, μια πιο ευαίσθητη τεχνική είναι η Διαφορική Παλμική Βολταμμετρία (DPV), σύμφωνα με την οποία προκαλείται σημαντική μείωση του ανεπιθύμητου χωρητικού ρεύματος και βελτίωση της ευαισθησίας των αναλυτικών προσδιορισμών, όπως αναφέρεται και στο θεωρητικό μέρος. (59)

Επομένως, ίδιου όγκου σταγόνες από τις προαναφερθείσες ουσίες, τοποθετήθηκαν με την ίδια σειρά στην επιφάνεια ενός νέου καθαρισμένου ηλεκτροδίου χρυσού DRP-C220 BT και προέκυψε το γράφημα 24. Επίσης, παράχθηκε ενζυματικά στους 20 °C θειοχολίνη 5 mM σε απεσταγμένο νερό και τοποθετήθηκε στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Ο στόχος της χρήσης αυτού του διαλύματος ήταν η μελέτη της επίδρασης των αλάτων του Phosphate Buffer στο προκύπτον σήμα, δεδομένου ότι αυτή η τεχνική είναι πιο ευαίσθητη.



Γράφημα 24: DPV για το Phosphate Buffer 50 mM με 0,1 M KCl, τη θειοχολίνη σε Phosphate Buffer αλλά και σε απεσταγμένο νερό με συγκέντρωση 5mM

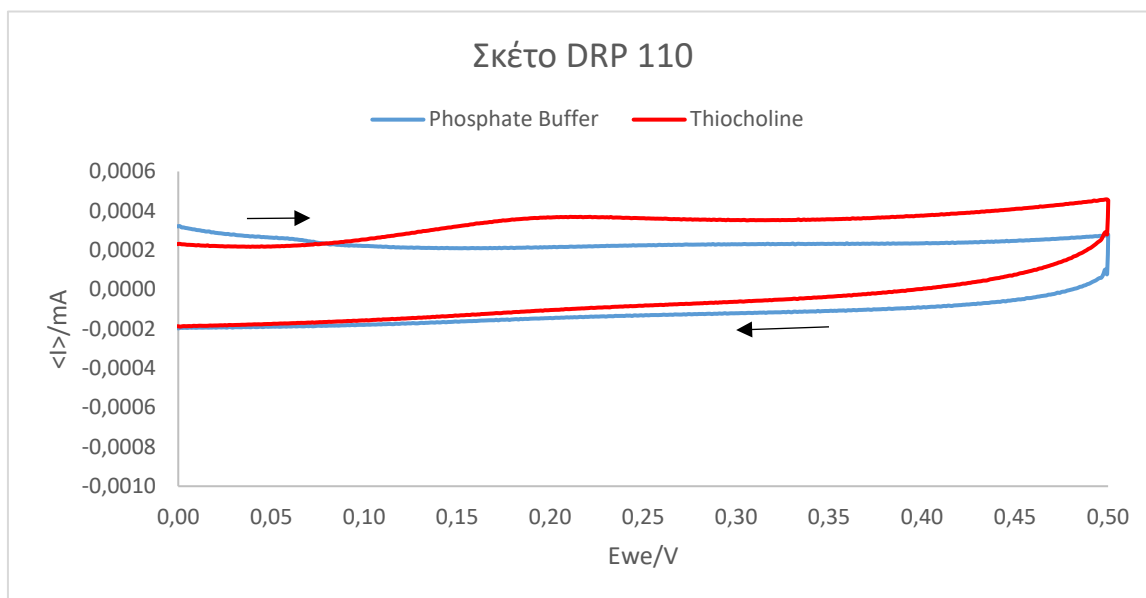
Σύμφωνα με το Γράφημα 24, η οξείδωση της κάθε ουσίας πραγματοποιείται σε διαφορετικό δυναμικό κι έτσι η ανίχνυσή της γίνεται πιο εφικτή. Στην περίπτωση αυτή, το Phosphate Buffer αποδίδει το χαμηλότερο σήμα σε αυτό το εύρος δυναμικού, ενώ το σήμα της θειοχολίνης σε Phosphate Buffer παραμένει χαμηλό στα χαμηλά δυναμικά, μετά τα 0,8 V αρχίζει να αυξάνει παρουσιάζοντας μια κορυφή περίπου στα 0,95 V.

Αντίθετα, το σήμα της θειοχολίνης σε απεσταγμένο νερό ενώ παραμένει χαμηλό στα χαμηλά δυναμικά, παρουσιάζει μια αρκετά μεγαλύτερη και ξεκάθαρη κορυφή στα 0,8 V. Είναι ξεκάθαρο από το παραπάνω γράφημα πως η επίδραση των αλάτων στο διάλυμα του Phosphate Buffer, κατά τη σάρωση του δυναμικού στην κυκλική βολταμμετρία κρίνεται αρκετά σημαντική για τη δυσκολία ανίχνευσης της θειοχολίνης. Με άλλα λόγια, η κορυφή που σχηματίζεται στα 0,95 V (κόκκινο χρώμα) δεν οφείλεται ξεκάθαρα στην ανίχνευση της θειοχολίνης, αλλά περισσότερο στην ανίχνευση των αλάτων του Phosphate Buffer, όπως φαίνεται και από το ψηλό σήμα που παρουσιάζουν στην περιοχή των 0,9 έως 1 V (γαλάζιο χρώμα). Γι'αυτό το λόγο, κρίνεται απαραίτητη η ανίχνευση της θειοχολίνης σε χαμηλότερα δυναμικά, μακριά από την περιοχή ανίχνευσης των αλάτων.

Επιπλέον, η κορυφή που σχηματίζεται για το διάλυμα θειοχολίνης σε Phosphate Buffer, ανιχνεύεται στα 1,3 μA , ενώ η αντίστοιχη της θειοχολίνης σε νερό, ανιχνεύεται σχεδόν στα 4 μA . Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, τα αποτελέσματα του παραπάνω γραφήματος είναι αποδεκτά καθώς η οξείδωση της θειοχολίνης μπορεί να ανιχνευθεί στην περιοχή από 0,7 έως 0,9 V στην επιφάνεια ενός ηλεκτροδίου χρυσού. (58)(60)

Παρόλα αυτά, σε αυτό το σημείο αξίζει να σημειωθεί πως σε αυτά τα ψηλά δυναμικά, το ένζυμο είναι αρκετά ευαίσθητο γι' αυτό και απαιτείται η ανίχνευση της θειοχολίνης σε χαμηλότερες τιμές δυναμικού. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με αύξηση της αγωγιμότητας της επιφάνειας ή με χρήση πιο ευαίσθητου ενζυμικού συστήματος όπως η γενετικά τροποποιημένη ακετυλοχολινεστεράση. Για την καλύτερη ακινητοποίηση του ενζύμου καθώς και για την αύξηση της αγωγιμότητας είναι πιθανή η τροποποίηση της επιφάνειας του ηλεκτροδίου χρυσού.

Παράλληλα, όπως και στα ηλεκτρόδια χρυσού, έτσι και με τα ηλεκτρόδια άνθρακα, το επόμενο στάδιο του πειράματος ήταν η μέτρηση του ρεύματος των δύο σημαντικών ουσιών: του Phosphate Buffer και της ενζυμικά παραγόμενης θειοχολίνης (thiocholine) με συγκέντρωση 5mM.



Γράφημα 25: CV για το Phosphate Buffer 50 mM με 0,1 M KCl και τη θειοχολίνη (5mM) με scan rate 50 mV/s σε ηλεκτρόδιο άνθρακα

Για να ληφθούν τα βολταμογραφήματα που φαίνονται στο Γράφημα 25, τοποθετήθηκε σταγόνα 60 μL αρχικά από το Phosphate Buffer 50 mM με 0,1 M KCl με pH 7,4 και σταγόνα 60 μL από το διάλυμα θειοχολίνης στην επιφάνεια ενός ηλεκτροδίου άνθρακα DRP-110. Τα ρεύματα που ανιχνεύονται στην ατροποποίητη επιφάνεια του ηλεκτροδίου στο παραπάνω γράφημα είναι πολύ χαμηλά.

Το γράφημα της οξειδωσης της θειοχολίνης (κόκκινο χρώμα στο Γράφημα 25) παρουσιάζει λίγο διαφορετική συμπεριφορά στο σήμα από τα αντίστοιχα γραφήματα που αφορούν τα ηλεκτρόδια χρυσού, ενώ το γράφημα του Phosphate Buffer συμπίπτει. Παρόλα αυτά, παρατηρείται ο σχηματισμός μιας μικρής κορυφής στα 200 mV με 0,36 μA σήμα και μια συνολική άνοδος του σήματος της θειοχολίνης έναντι του σήματος του Phosphate Buffer.

5.3 Τροποποίηση επιφάνειας ηλεκτροδίων χρυσού

Μιας και τα ηλεκτρόδια χρυσού, απέδωσαν μεγαλύτερα σήματα χάριν στην αυξημένη αγωγιμότητα του χρυσού ως υλικό έναντι του άνθρακα, τα πειράματα που ακολούθησαν αφορούσαν τη βελτιστοποίηση του συστήματος ανίχνευσης με βάση τις επιφάνειες χρυσού. Όπως αναφέρθηκε και στην προηγούμενη ενότητα, κρίνεται αναγκαία η τροποποίηση της επιφάνειας με στόχο τη μεγαλύτερη ευαισθησία του ηλεκτροχημικού αισθητήρα και την καλύτερη ακινητοποίηση του ενζύμου στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου.

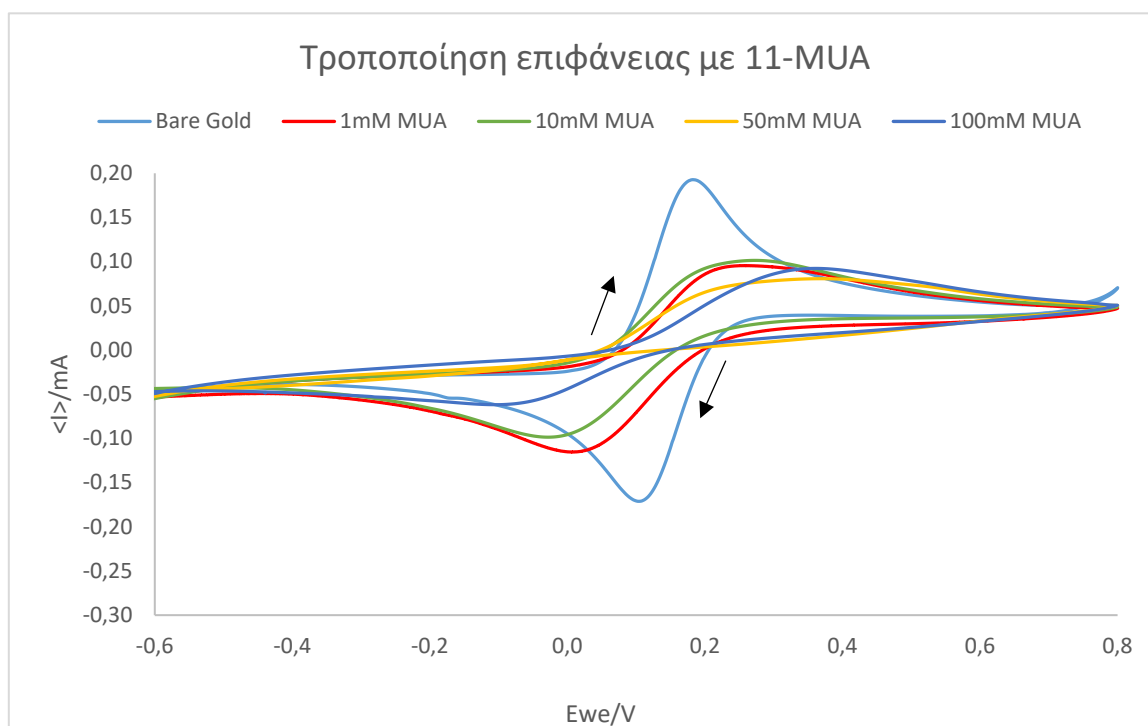
5.3.1 Τροποποίηση επιφάνειας ηλεκτροδίων χρυσού με SAMs

Αρχικά, στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση του μερκαπτο-ενδεκανοϊκού οξέος (11-MUA), το οποίο ως ομάδα κεφαλής έχει θειόλες και ως ομάδα ουράς έχει καρβοξύλια. Με βάση τη βιβλιογραφία είναι ο πιο ευρέως χρησιμοποιούμενος τύπος SAM σε επιφάνειες χρυσού. (63) (64)

Το μερκαπτο-ενδεκανοϊκό οξύ διαλυμένο σε αιθανόλη τοποθετήθηκε σε διαφορετικές συγκεντρώσεις με σταγόνα σε 4 ηλεκτρόδια χρυσού, τα οποία έμειναν κατά τη διάρκεια 18 ωρών περίπου στο ψυγείο μέσα σε τρυβλία πετρί με νωπό από αιθανόλη χαρτί. Τα ηλεκτρόδια αυτά είχαν αρχικά καθαριστεί ηλεκτροχημικά και έπειτα χαρακτηριστεί με

κυκλική βολταμετρία σε διάλυμα 5 mM $K_3Fe(CN)_6 - K_4Fe(CN)_6$ σε 1x PBS. Έτσι, τοποθετήθηκαν στα ηλεκτρόδια σταγόνες 100 μ L από 1 mM, 10 mM, 50 mM και 100 mM αντίστοιχα και αποθηκεύτηκαν στο ψυγείο. Την επόμενη μέρα, τα ηλεκτρόδια αυτά ξεπλύθηκαν με αιθανόλη και χαρακτηρίστηκαν ξανά με κυκλική βολταμετρία σε διάλυμα 5 mM $K_3Fe(CN)_6 - K_4Fe(CN)_6$ σε 1x PBS. Στο Γράφημα 26 παρουσιάζονται τα CVs των τροποποιημένων ηλεκτροδίων συγκριτικά με ένα καθαρό και ατροποποίητο.

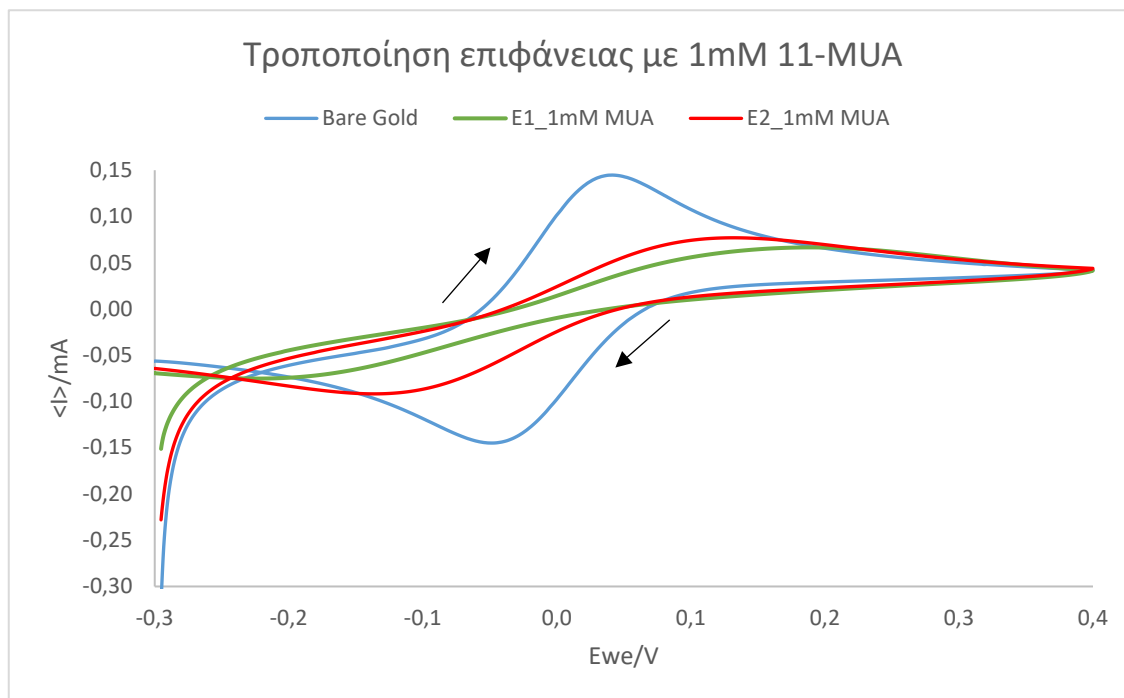
Είναι προφανές πως το μερκαπτο-ενδεκανοϊκό οξύ (11-MUA), μετατρέπει την επιφάνεια σε πιο μονωτική, καθώς το σήμα των οξειδοαναγωγικών κορυφών είναι αρκετά χαμηλότερο από αυτό του ατροποποίητου ηλεκτροδίου. Όσο πιο μεγάλη είναι η συγκέντρωση του 11-MUA, τόσο πιο μονωτική γίνεται η επιφάνεια εξαιτίας της πιο πυκνής αυτοοργάνωσης των οργανικών μορίων σε αυτή.



Γράφημα 26: CVs για ατροποποίητο ηλεκτρόδιο χρυσού και τροποποιημένο με 1 mM, 10 mM, 50 mM και 100 mM 11-MUA, ο χαρακτηρισμός έγινε σε 5 mM $K_3Fe(CN)_6 - K_4Fe(CN)_6$ σε 1x PBS με scan rate 50 mV/s

Η μόνωση της επιφάνειας συνεπάγεται χαμηλότερη ευαισθησία του αισθητήρα, καθώς όλο και λιγότερα ηλεκτρόνια που παράγονται κατά την οξείδωση φτάνουν στην επιφάνεια λόγω της πυκνής δομής, επομένως η ανίχνευση μικρών σημάτων καθίσταται δύσκολη. Γι'

αυτό επιλέχθηκε η χαμηλότερη συγκέντρωση 11-MUA, 1 mM, για επανάληψη της τροποποίησης της επιφάνειας δυο καθαρισμένων ηλεκτροδίων χρυσού με στόχο τον έλεγχο της αναπαραγωγιμότητας. (Γράφημα 27)



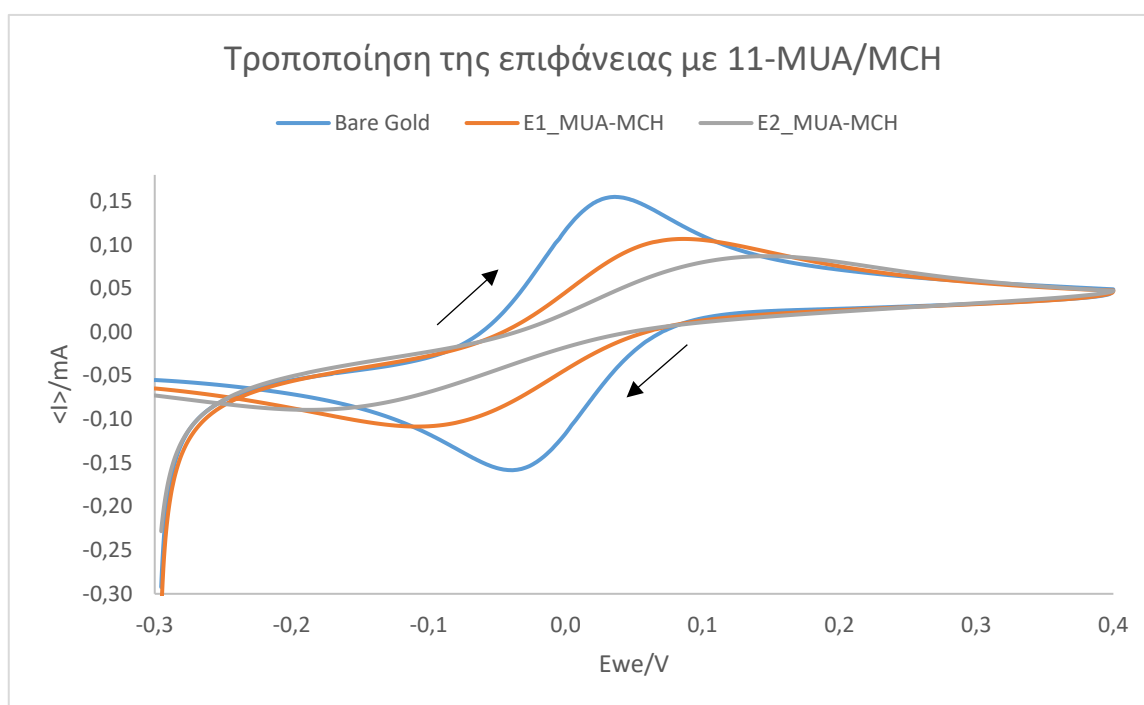
Γράφημα 27: CVs για ατροποποίητο ηλεκτρόδιο χρυσού και 2 τροποποιημένα με 1mM 11-MUA, ο χαρακτηρισμός έγινε σε 5 mM $K_3Fe(CN)_6 - K_4Fe(CN)_6$ σε 1x PBS με scan rate 50 mV/s

Από το Γράφημα 27 προκύπτει ότι ακόμη και μικρή συγκέντρωση του 11-MUA εξακολουθεί να μετατρέπει την επιφάνεια σε αρκετά μονωτική. Επίσης, η εναπόθεση ίδιας συγκέντρωσης 11-MUA στις δυο επιφάνειες χρυσού και με ίδιες συνθήκες αποθήκευσης, δεν οδηγεί σε ίδια τροποποίηση των επιφανειών. Δεν υπάρχει αναπαραγωγιμότητα σε αυτή τη μέθοδο, διότι τα οργανικά μόρια αυτοδιατάσσονται με τυχαίο και διαφορετικό τρόπο πάνω στην επιφάνεια. Επιπλέον, το διαλυμα 11-MUA σε αιθανόλη παρατηρήθηκε πως προκαλεί φθορά στο πλαστικό μέρος του ηλεκτροδίου, όπως φαίνεται στην Εικόνα 54.



Εικόνα 54: Φθορά ηλεκτροδίου χρυσού με τη χρήση 11-MUA σε αιθανόλη

Στην προσπάθεια να αντιμετωπιστεί το πρόβλημα της μονωτικής επιφάνειας, δοκιμάστηκε η μίξη του μερκαπτο-ενδεκανοϊκού οξέος με τη μερκαπτο-εξανόλη (1 mM). Η μίξη αυτή, με βάση τη βιβλιογραφία, εξυπηρετεί την αποφυγή μεγάλων συσσωματωμάτων μερκοπτο-ενδεκανοϊκού οξέος με στόχο να φτάνουν τα ηλεκτρόνια πιο εύκολα στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου.



Γράφημα 28: CVs για ατροποποίητο ηλεκτρόδιο χρυσού και 2 τροποποιημένα με 1mM 11-MUA μαζί με MCH, ο χαρακτηρισμός έγινε σε 5 mM $K_3Fe(CN)_6 - K_4Fe(CN)_6$ σε 1x PBS με scan rate 50 mV/s

Στο Γράφημα 28 φαίνονται τα γραφήματα των δυο ηλεκτροδίων με ίδια συγκέντρωση 11-MUA και MCH (1 mM) και με ίδιες συνθήκες αποθήκευσης. Όπως φαίνεται και στο Γράφημα 23, η επιφάνεια εξακολουθεί να γίνεται μονωτική και με το μίγμα των οργανικών μορίων, αλλά σε ελαφρώς μικρότερο βαθμό. Δεν υπάρχει αναπαραγωγιμότητα ούτε σε αυτή τη μέθοδο, διότι τα οργανικά μόρια εξακολουθούν να αυτοδιατάσσονται με τυχαίο και διαφορετικό τρόπο πάνω στην επιφάνεια και άρα προκύπτουν διαφορετικά σήματα.

5.3.2 Τροποποίηση επιφάνειας ηλεκτροδίων χρυσού με Διαζωνικά Άλατα

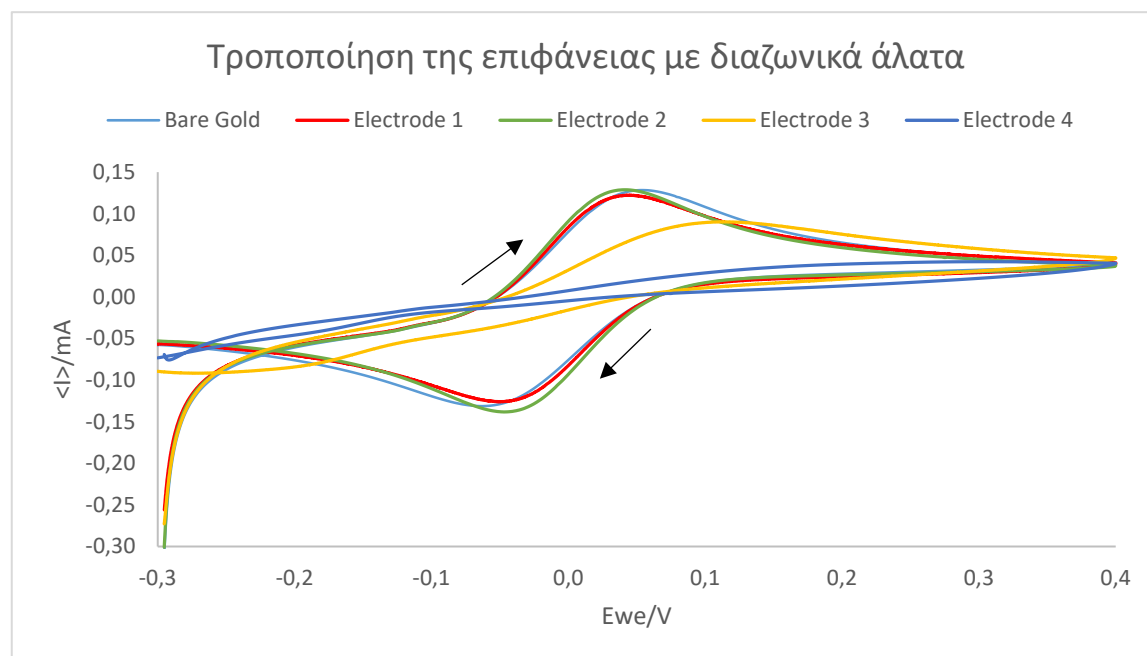
Παρατηρήθηκε ότι η τροποποίηση των επιφανειών των ηλεκτροδίων χρυσού με SAMs ή και μίγματα αυτών, δεν οδηγεί σε αναπαραγωγίσιμα αποτελέσματα ως προς τη διάταξη

των οργανικών μορίων στην επιφάνεια και άρα ως προς τα σήματα. Γι' αυτό και κρίθηκε ακατάλληλη η χρήση τους για την ακινητοποίηση του ενζύμου. Βιβλιογραφικά, έναν εναλλακτικό τρόπο αποτελεί η χρήση διαλυμάτων Διαζωνικών αλάτων (Diazonium Salt Solutions).

Η σύνθεση των διαζωνικών αλάτων φαίνεται στον παρακάτω πίνακα καθώς και η τροποποίηση των επιφανειών των ηλεκτροδίων χρυσού, η οποία επιτεύχθη κυρίως με δύο τρόπους, ηλεκτροχημικά (με CVs) και με φυσική προσρόφηση των αλάτων πάνω στην επιφάνεια.

Ηλεκτρόδιο	Διάλυμα	Τεχνική τροποποίησης	Συνθήκες τεχνικής
1	2mM 4-ABA, 2mM NaNO ₂ in 0.5 M HCl	Γραμμικό CV, 1 κύκλος	(0.6,-0.8)V, 50 mV/s
2	2mM 4-ABA, 2mM NaNO ₂ in 0.5 M HCl	CV, 4 κύκλοι	(0.6,-0.8)V, 50 mV/s
3	1.5 mM 4-ABA in 0.1 M KCl	CV, 4 κύκλοι	(0.2,1.2)V, 100 mV/s
4	2 mM 4-ABA in 0.1 M KCl	CV, 1 κύκλος	(0.2,1.2)V, 100 mV/s

Πίνακας 6: Τροποποίηση ηλεκτροδίων χρυσού με διαζωνικά άλατα με διαφορετικούς τρόπους



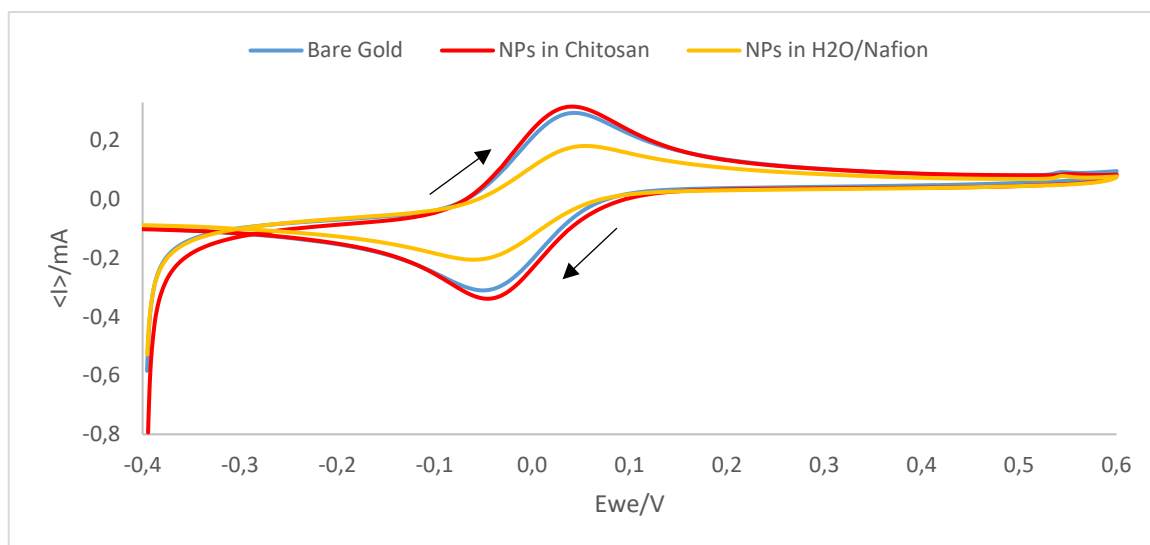
Γράφημα 29: CVs για το ατροποποίητο ηλεκτρόδιο χρυσού και για τα 4 τροποποιημένα ηλεκτρόδια του Πίνακα 6, ο χαρακτηρισμός έγινε σε 5 mM K₃Fe(CN)₆ - K₄Fe(CN)₆ σε 1x PBS με scan rate 50 mV/s

Ο αριθμός κάθε ηλεκτροδίου του Πίνακα 6 με την αντίστοιχη τροποποίηση στην επιφάνεια αντιστοιχίζεται στον αριθμό κάθε ηλεκτροδίου από το Γράφημα 29. Σύμφωνα με τα διαγράμματα που προκύπτουν, οι δυο πρώτες τροποποιήσεις που περιέχουν το 4-ABA και το NaNO_2 δε φαίνεται να βελτιώνουν ιδιαίτερα το σήμα των οξειδοαναγωγικών κορυφών, καθώς μοιάζει σαν μην έχει τροποποιηθεί επαρκώς η επιφάνεια. Αντίθετα, στην περίπτωση της τροποποίησης με 4-ABA και 4 ηλεκτροχημικούς κύκλους, η επιφάνεια γίνεται αρκετά μονωτική και στην περίπτωση της τροποποίησης με 4-ABA και 1 ηλεκτροχημικό κύκλο, η επιφάνεια μετατρέπεται σε πολύ μονωτική. Επομένως, καθίσταται δύσκολη η μεταφορά ηλεκτρονίων προς την επιφάνεια με στόχο την ανίχνευση μιας επιθυμητής ουσίας όπως η θειοχολίνη.

5.3.3 Τροποποίηση επιφάνειας ηλεκτροδίων χρυσού με νανοσωματίδια μαγνητήτη Fe_3O_4

Στην προσπάθεια κατάλληλης τροποποίησης της ήδη καθαρής επιφάνειας χρυσού, δοκιμάστηκε και το πρωτόκολλο των Wang et al.(71), με κάποιες διαφοροποιήσεις. Έτσι, για την τροποποίηση της επιφάνειας με νανοσωματίδια μαγνητήτη απαιτείται η διασπορά τους σε διάλυμα χιτοζάνης μεσαίου μοριακού βάρους. Το πολυμερικό δίκτυο της χιτοζάνης εξυπηρετεί την ομοιόμορφη και σταθερή ακινητοποίηση του ενζύμου, η δράση του οποίου παρουσία υποστρώματος ανιχνεύεται από τα νανοσωματίδια.

Επομένως, 0,2g Χιτοζάνης μεσαίου μοριακού βάρους προστέθηκαν σε 100 mL Acetate Buffer 50 mM με pH 4 (φτιαγμένο από Sodium Acetate και 1% Acetic Acid) και το διάλυμα αφέθηκε υπό ανάδευση μέχρι να γίνει ομοιογενές. Έπειτα, 0,05 mg/mL νανοσωματιδίων Fe_3O_4 , προστέθηκαν σε 10 mL και το τελικό διάλυμα εισήχθη σε water bath για 30 λεπτά sonication. Τέλος, σταγόνα 4 μL από αυτό το διάλυμα εναποτέθηκε με πιπέτα στην επιφάνεια εργασίας του ηλεκτροδίου και αφέθηκε να στεγνώσει. Για μεγαλύτερη σταθεροποίηση του στρώματος πάνω στην επιφάνεια, το ηλεκτρόδιο εισήχθη σε φούρνο στους 80 °C για μισή ώρα. Ταυτόχρονα σε ένα δεύτερο ηλεκτρόδιο τοποθετήθηκε ίδιος όγκος από το εξής μίγμα: στο διάλυμα 0,1% Nafion σε αποσταγμένο νερό προστέθηκαν 0,5 mg νανοσωματιδίων Fe_3O_4 . Μόλις η επιφάνεια των ηλεκτροδίων στέγνωσε, χαρακτηρίστηκαν με κυκλική βολταμμετρία σε Phosphate Buffer 50 mM με pH 7,4 όπως φαίνεται στο Γράφημα 32.



Γράφημα 30: Τροποποίηση επιφάνειας χρυσού με NPs μαγνητήτη σε διαφορετικά διαλύματα, ο χαρακτηρισμός έγινε σε Phosphate Buffer 50 mM, με scan rate 50 mV/s

Σύμφωνα με το Γράφημα 30, φαίνεται πως η τροποποίηση της επιφάνειας χρυσού με τα νανοσωματίδια μαγνητήτη μέσα σε χιτοζάνη δε βελτιώνει ιδιαίτερα το σήμα που προκύπτει σε σχέση με την ατροποποίητη επιφάνεια. Αντίθετα, η τροποποίηση με τα νανοσωματίδια διαλυμένα σε νερό και Nafion φαίνεται πως μετατρέπει την επιφάνεια σε πιο μονωτική. Επομένως, και τα δύο διαλύματα με νανοσωματίδια μαγνητήτη αποτυγχάνουν να ενισχύσουν τα προκύπτοντα σήματα γι' αυτό και δεν εναποτέθηκε στην τροποποιημένη επιφάνεια ένζυμο.

5.4 Τροποποίηση επιφάνειας ηλεκτροδίων άνθρακα

Οι τροποποιήσεις των επιφανειών χρυσού που δοκιμάστηκαν δεν οδήγησαν σε αναπαραγωγίσιμες μετρήσεις, επομένως ήταν αδύνατη η ακινητοποίηση της ακετυλοχολινεστεράσης πάνω σε αυτές. Επιπλέον, απαιτείται η βελτιστοποίηση της ανίχνευσης των επιθυμητών ουσιών σε χαμηλότερα δυναμικά με ταυτόχρονη αύξηση της ευαισθησίας του ηλεκτροχημικού βιοαισθητήρα. Με βάση τη βιβλιογραφία, αυτό μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση screen printed ηλεκτροδίων άνθρακα κατάλληλα τροποποιημένων.

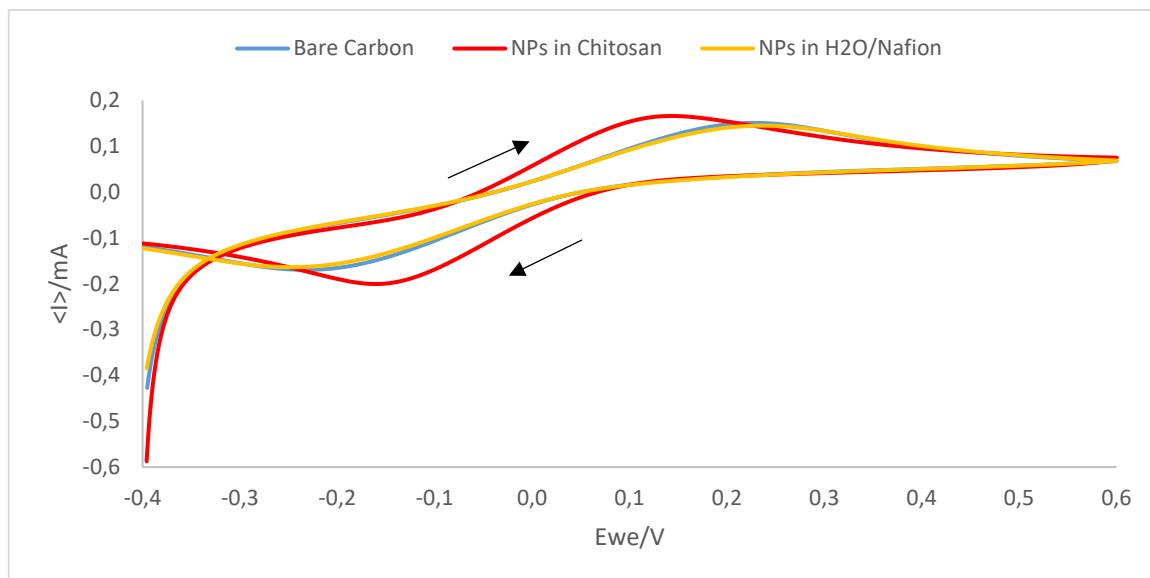
Σχεδόν σε όλη τη βιβλιογραφία, η επιφάνειες των ηλεκτροδίων άνθρακα τροποποιούνται με διάφορες τεχνικές, ώστε να γίνονται πιο ευαίσθητες στην ανίχνευση της θειοχολίνης σε όσο το δυνατόν χαμηλότερα δυναμικά για να μην επηρεάζεται η λειτουργικότητα του ενζύμου.

5.4.1 Τροποποίηση με νανοσωματίδια μαγνητήτη Fe₃O₄

Μελετήθηκε αρχικά η τροποποίηση των επιφανειών άνθρακα με νανοσωματίδια μαγνητήτη Fe₃O₄ ενσωματωμένα σε χιτοζάνη όπως αναφέρεται στο μεγαλύτερο μέρος της βιβλιογραφίας και σε μίγμα αποσταγμένου νερού με Nafion. (70)(71)(72) Για την τροποποίηση της επιφάνειας με νανοσωματίδια μαγνητήτη απαιτείται η διασπορά τους σε διάλυμα χιτοζάνης μεσαίου μοριακού βάρους. Το πολυμερικό δίκτυο της χιτοζάνης εξυπηρετεί την ομοιόμορφη και σταθερή ακινητοποίηση του ενζύμου, η δράση του οποίου παρουσία υποστρώματος ανιχνεύεται από τα νανοσωματίδια.

Έτσι, 0,2g Χιτοζάνης μεσαίου μοριακού βάρους προστέθηκαν σε 100 mL Acetate Buffer 50 mM με pH 4 (φτιαγμένο από Sodium Acetate και 1% Acetic Acid) και το διάλυμα αφέθηκε υπό ανάδευση μέχρι να γίνει ομοιογενές. Έπειτα, 0,05 mg/mL νανοσωματιδίων Fe₃O₄, προστέθηκαν σε 10 mL και το τελικό διάλυμα εισήχθη σε water bath για 30 λεπτά sonication. Τέλος, σταγόνα 4 μL από αυτό το διάλυμα εναποτέθηκε με πιπέτα στην επιφάνεια εργασίας του ηλεκτροδίου και αφέθηκε να στεγνώσει. Για μεγαλύτερη σταθεροποίηση του στρώματος πάνω στην επιφάνεια, το ηλεκτρόδιο εισήχθη σε φούρνο στους 80 °C για μισή ώρα.

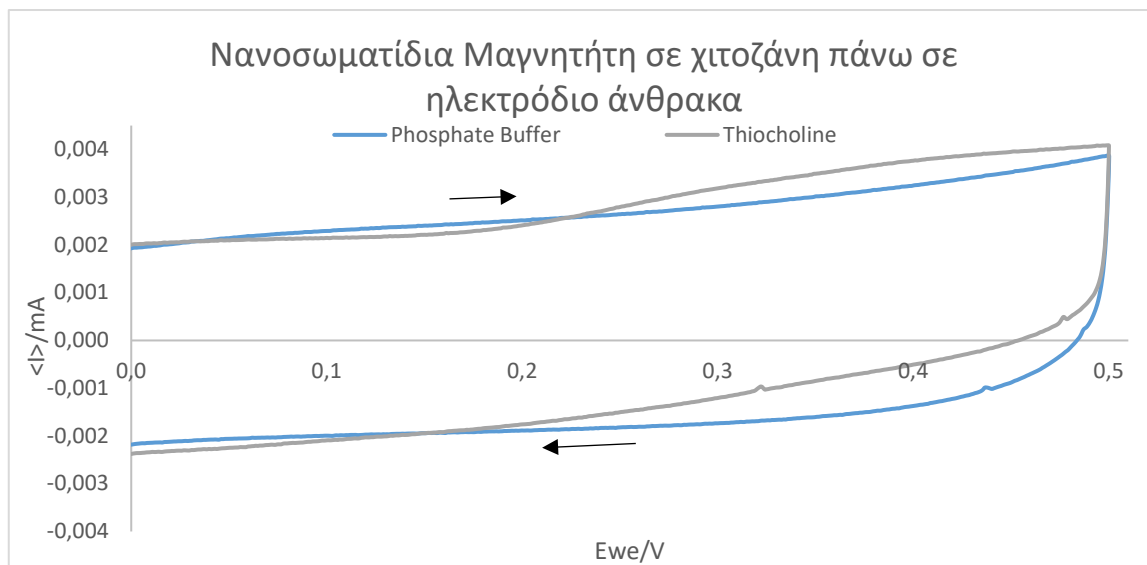
Ταυτόχρονα σε ένα δεύτερο ηλεκτρόδιο τοποθετήθηκε ίδιος όγκος από το εξής μίγμα: στο διάλυμα 0,1% Nafion σε αποσταγμένο νερό προστέθηκαν 0,5 mg νανοσωματιδίων Fe₃O₄. Μόλις η επιφάνεια των ηλεκτροδίων στέγνωσε, χαρακτηρίστηκαν με κυκλική βολταμμετρία σε Phosphate Buffer 50 mM με pH 7,4 όπως φαίνεται στο Γράφημα 31.



Γράφημα 31: Τροποποίηση επιφάνειας άνθρακα με NPs μαγνητήτη σε διαφορετικά διαλύματα, ο χαρακτηρισμός έγινε σε 5 mM $K_3Fe(CN)_6 - K_4Fe(CN)_6$ σε 1x PBS, με scan rate 50 mV/s

Σύμφωνα με το Γράφημα 31, φαίνεται πως η τροποποίηση της επιφάνειας άνθρακα με τα νανοσωματίδια μαγνητήτη μέσα σε χιτοζάνη βελτιώνει το σήμα που προκύπτει σε αντίθεση με την ατροποποίητη επιφάνεια ή με αυτή που τροποποιήθηκε με νανοσωματίδια διαλυμένα σε νερό και Nafion.

Κατά συνέπεια, εξετάστηκε το αν είναι εφικτή η ανίχνευση θειοχολίνης με την τροποποιημένη επιφάνεια με νανοσωματίδια μαγνητήτη σε χιτοζάνη. Επομένως, χρησιμοποιήθηκε Phosphate Buffer 50 mM με pH 7,4 και διάλυμα 5mM θειοχολίνης που προέκυψε ενζυματικά και υπολογίστηκε η συγκέντρωσή της με βάση το νόμο Beer-Lambert (Εξίσωση 7).



Γράφημα 32: CVs για ηλεκτρόδιο άνθρακα τροποποιημένο με νανοσωματίδια μαγνητήτη σε χιτοζάνη, με Phosphate Buffer 50 mM και με 5mM θειοχολίνη, με scan rate 50 mV/s

Το σήμα του Phosphate Buffer στο Γράφημα 31, είναι ίδιο με το αντίστοιχο του ατροποποίητου ηλεκτροδίου άνθρακα, όπως φαίνεται στο Γράφημα 25. Αντίθετα, το σήμα της θειοχολίνης είναι ελαφρώς χαμηλότερο με τη τροποποίηση με νανοσωματίδια μαγνητήτη σε χιτοζάνη. Επίσης, στο Γράφημα 25, η μικρή κορυφή της θειοχολίνης εντοπίζεται στα 200 mV περίπου, ενώ στο Γράφημα 31, το διαγραμμα της θειοχολίνης μπορεί να θεωρηθεί ότι παρουσιάζει μικρή κορυφή στα 400 mV περίπου.

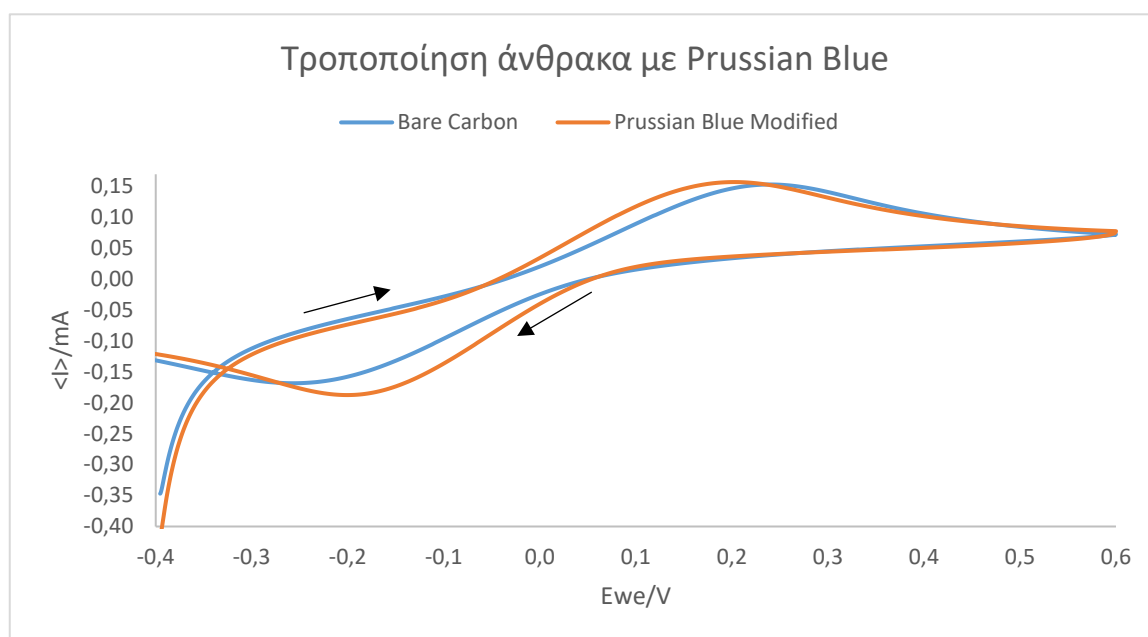
Επομένως, φαίνεται πως η τροποποίηση της επιφάνειας του ηλεκτροδίου άνθρακα με νανοσωματίδια Fe_3O_4 σε χιτοζάνη, μπορεί αρχικά να βελτιώνει λίγο την αγωγιμότητα της επιφάνειας σε σύγκριση με ένα ατροποποίητο ηλεκτρόδιο, αλλά στην προσπάθεια ανίχνευσης της θειοχολίνης, λαμβάνονται αρκετά χαμηλά σήματα παρουσία του Phosphate Buffer.

5.4.2 Τροποποίηση με Prussian Blue

Στη συνέχεια, με βάση τη βιβλιογραφία, χρησιμοποιείται το Prussian Blue πάνω στην επιφάνεια ηλεκτροδίων άνθρακα με στόχο την ανίχνευση της θειοχολίνης σε χαμηλότερες τιμές δυναμικού. (68) Ακολουθήθηκαν οι εξής δύο τρόποι για τη χρήση του Prussian Blue,

ο πρώτος ήταν με τα DRP-710, εμπορικά διαθέσιμα ηλεκτρόδια της εταιρίας Dropsens και ο δεύτερος με σύνθεση των νανοσωματιδίων στο εργαστήριο, όπως θα περιγραφεί παρακάτω.

Σύμφωνα με δημοσίευση (68), παρασκευάστηκαν τα εξής δύο πρότυπα διαλύματα: α) 100 mM Potassium Ferricyanide ($K_3Fe(CN)_6$) σε 10 mM HCl και β) 100 mM $FeCl_3$ σε 10 mM HCl. Από τα παραπάνω δύο διαλύματα λήφθηκαν 5 και 5 μL και αναμίχθηκαν σε ένα tube και το τελικό διάλυμα που προέκυψε, απέκτησε ένα μπλε χρώμα. Πριν εναποτεθεί το μίγμα στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου, ακολουθήθηκε μια προ-επεξεργασία της επιφάνειας με αμπερομετρία στα 1,7 V για 3 λεπτά σε 50 mM Phosphate Buffer pH 7,4 και 0,1 M KCl. Έπειτα, τα 10 μL του διαλύματος, εναποτέθηκαν στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου για 10 λεπτά και ύστερα ξεπλύθηκαν με διάλυμα 10 mM HCl. Τέλος, το ηλεκτρόδιο τοποθετήθηκε για 90 λεπτά σε φούρνο στους 100 °C.

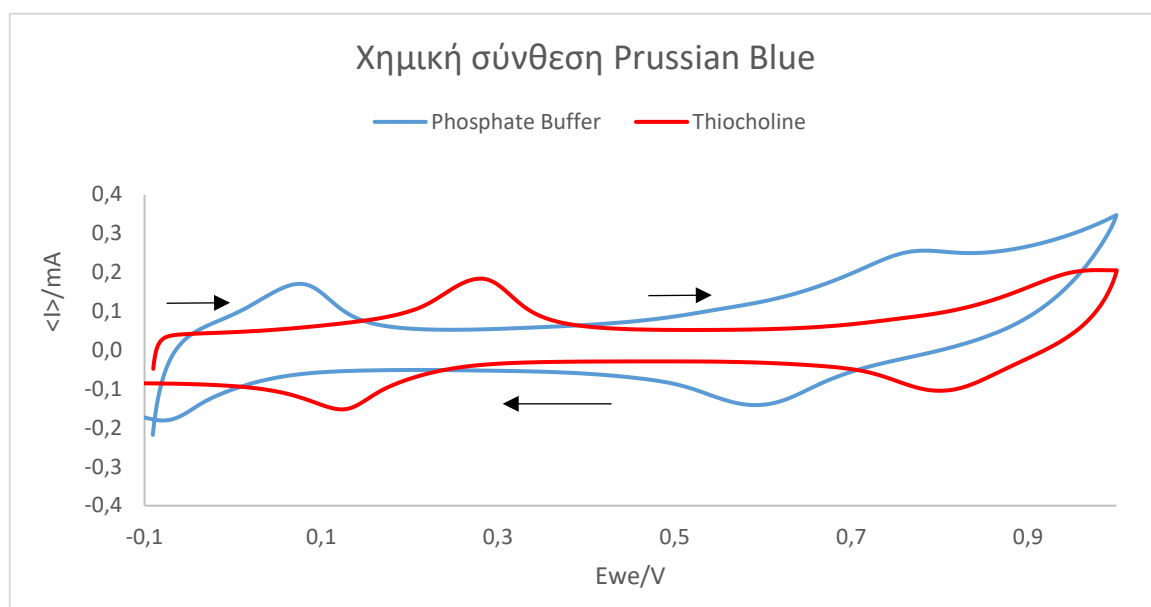


Γράφημα 33: CVs για το χαρακτηρισμό ενός ατροποποίητου ηλεκτροδίου άνθρακα και ενός τροποποιημένου με χημική σύνθεση Prussian Blue, χαρακτηρισμός σε 50 mM Phosphate Buffer pH 7,4+ 0,1 M KCl με 5mM $K_3Fe(CN)_6 - K_4Fe(CN)_6$, με scan rate 50 mV/s

Ύστερα από τη χημική σύνθεση του Prussian Blue, το τροποποιημένο ηλεκτρόδιο και ένα ατροποποίητο ηλεκτρόδιο άνθρακα, χαρακτηρίστηκαν με CV σε διάλυμα 50 mM Phosphate Buffer pH 7,4+ 0,1 M KCl με 5mM $K_3Fe(CN)_6 - K_4Fe(CN)_6$ ώστε να διαπιστωθεί το αποτέλεσμα της τροποποίησης της επιφάνειας (Γράφημα 33). Πράγματι,

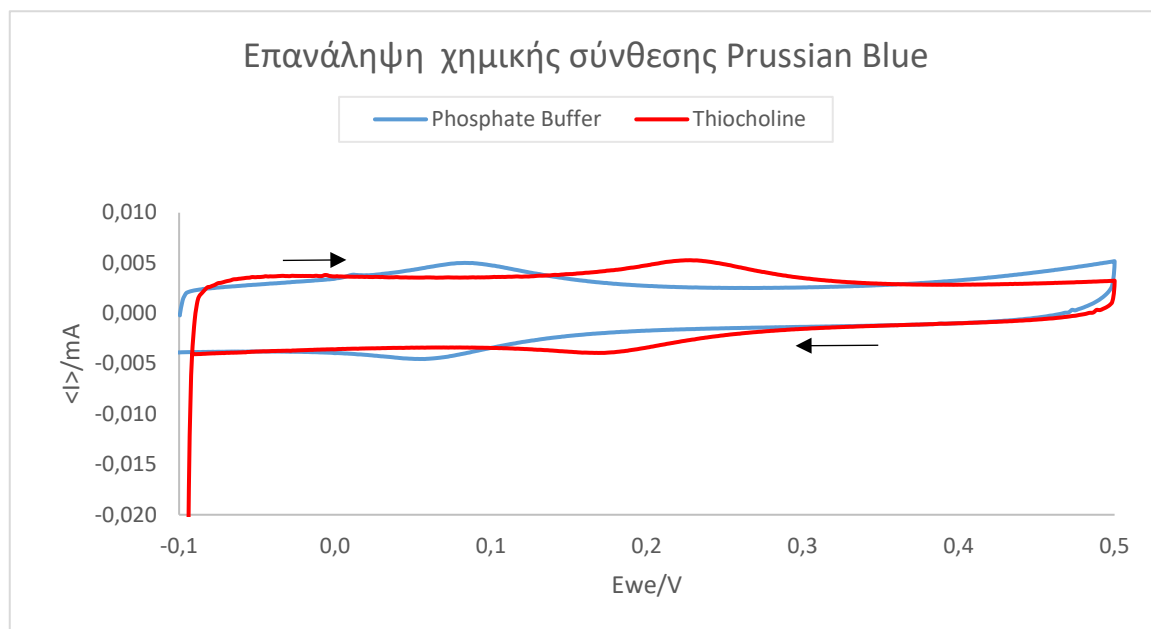
φαίνεται πως η επιφάνεια μετατρέπεται σε ελαφρώς πιο αγώγιμη με τη χημική σύνθεση του Prussian Blue και η απόσταση μεταξύ των οξειδοαναγωγικών κορυφών μικραίνει. Πιο συγκεκριμένα, για το ατροποποίητο ηλεκτρόδιο το ΔE_p είναι 468 mV, ενώ για το τροποποιημένο με Prussian Blue είναι 365 mV.

Εφόσον η χημική σύνθεση του Prussian Blue τροποποίησε ικανοποιητικά την επιφάνεια του ηλεκτροδίου, εξετάστηκε η δυνατότητα ανίχνευσης της εξυμικά παραγόμενης θειοχολίνης (5mM τελική συγκέντρωση). Στο Γράφημα 34, παρουσιάζονται τα σήματα των ουσιών πάνω στην τροποποιημένη με Prussian Blue επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Το διάγραμμα της θειοχολίνης έναντι του Phosphate Buffer παρουσιάζει μικρή αλλαγή στη συμπεριφορά, καθώς εμφανίζει μια κύρια οξειδωτική κορυφή μετατοπισμένη περίπου στα 0,3 V με σημαντικό σήμα στα 184 μA , ενώ η πρώτη κορυφή του Buffer φτάνει τα 167 μA . Επιπλέον, η αύξηση του σήματος που παρουσιάζει το Buffer μετά τα 0,7 V, δεν διατηρείται στο διάγραμμα της θειοχολίνης.



Γράφημα 34: CVs για ηλεκτρόδιο άνθρακα τροποποιημένο με Prussian Blue, με Phosphate Buffer 50 mM, και με 5mM θειοχολίνη, με scan rate 50 mV/s

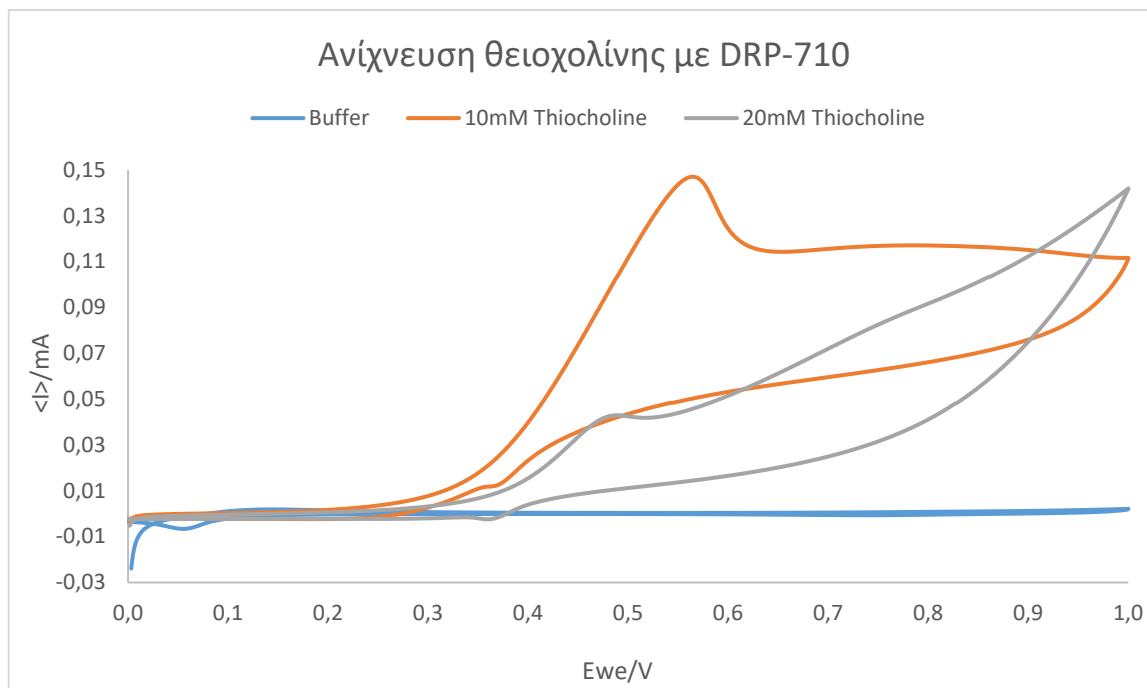
Το πείραμα επαναλήφθηκε με τη χημική σύνθεση του Prussian Blue πάνω στην επιφάνεια προ-επεξεργασμένου με αμπερομετρία, ηλεκτροδίου, η οποία τελικά χαρακτηρίστηκε με 50 mM Phosphate Buffer pH 7,4 με 0,1 M KCl και με διάλυμα 5mM ενζυμικά παραγόμενης θειοχολίνης.



Γράφημα 35: Επαναληπτικά CVs για ηλεκτρόδιο άνθρακα τροποποιημένο με Prussian Blue, με Phosphate Buffer 50 mM και με θειοχολίνη, με scan rate 50 mV/s

Τα αποτελέσματα στο Γράφημα 35 διαφέρουν αρκετά από αυτά στο Γράφημα 34 και ως προς την ένταση του ρεύματος αλλά και ως προς τη συμπεριφορά. Από τη μία επιτυγχάνεται η ανίχνευση της θειοχολίνης σε χαμηλότερο δυναμικό με τη βοήθεια της τροποποίησης (220 mV, κόκκινο διάγραμμα στο Γράφημα 35), από την άλλη όμως αποτυγχάνεται η επαναληψιμότητα της μεθόδου. Ενδεχομένως, αυτό οφείλεται στην χημεία που λαμβάνει χώρα κατά τη σύνθεση του Prussian Blue ή και πάνω στην επιφάνεια από τη στιγμή που εαποτίθεται, όπως και στον τρόπο εναπόθεσης.

Για την επίλυση αυτών των προβλημάτων, χρησιμοποιήθηκαν τα εμπορικά διαθέσιμα ηλεκτρόδια άνθρακα DRP-710 με ήδη τροποποιημένη με Prussian Blue επιφάνεια. Σε ένα ηλεκτρόδιο εναποτέθηκε σταγόνα από 50 mM Phosphate Buffer pH 7,4 με 0,1 M KCl και από διάλυμα θειοχολίνης η οποία παράχθηκε ενζυμικά και υπολογίστηκε η συγκέντρωσή της με βάση το νόμο Beer-Lambert (Εξίσωση 7) και χαρακτηρίστηκε σύμφωνα με τις γνωστές συνθήκες. (Γράφημα 36)



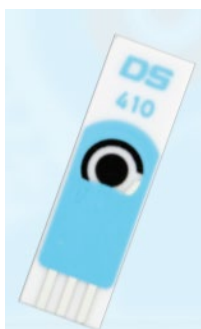
Γράφημα 36: CVs για ηλεκτρόδιο DRP-710, με Phosphate Buffer 50 mM και με θειοχολίνη, με scan rate 50 mV/s

Σύμφωνα με το Γράφημα 36, το σήμα του Phosphate Buffer (μπλε γραμμή) είναι πολύ χαμηλό όπως και στο Γράφημα 35. Αντίθετα, η εμφάνιση των κορυφών που αφορούν την ανίχνευση της θειοχολίνης, παρουσιάζεται σε διαφορετικό δυναμικό σε αντίθεση με την περίπτωση της χημικής σύνθεσης του Prussian Blue. Επίσης, παρατηρείται πως όσο μικρότερη είναι η συγκέντρωση της θειοχολίνης, το προκύπτον σήμα είναι πιο ψηλό και μετατοπισμένο προς ψηλότερα δυναμικά. Δηλαδή, τα 20 mM θειοχολίνης ανιχνεύονται στα 480 mV (και 42 μ A), ενώ τα 10 mM θειοχολίνης ανιχνεύονται στα 571 mV (και 146 μ A). Από τη βιβλιογραφία είναι γνωστό πως η θειοχολίνη ανιχνεύεται γύρω στα 400 mV με τη βοήθεια του Prussian Blue.

5.4.3 Τροποποίηση με Cobalt Phthalocyanine

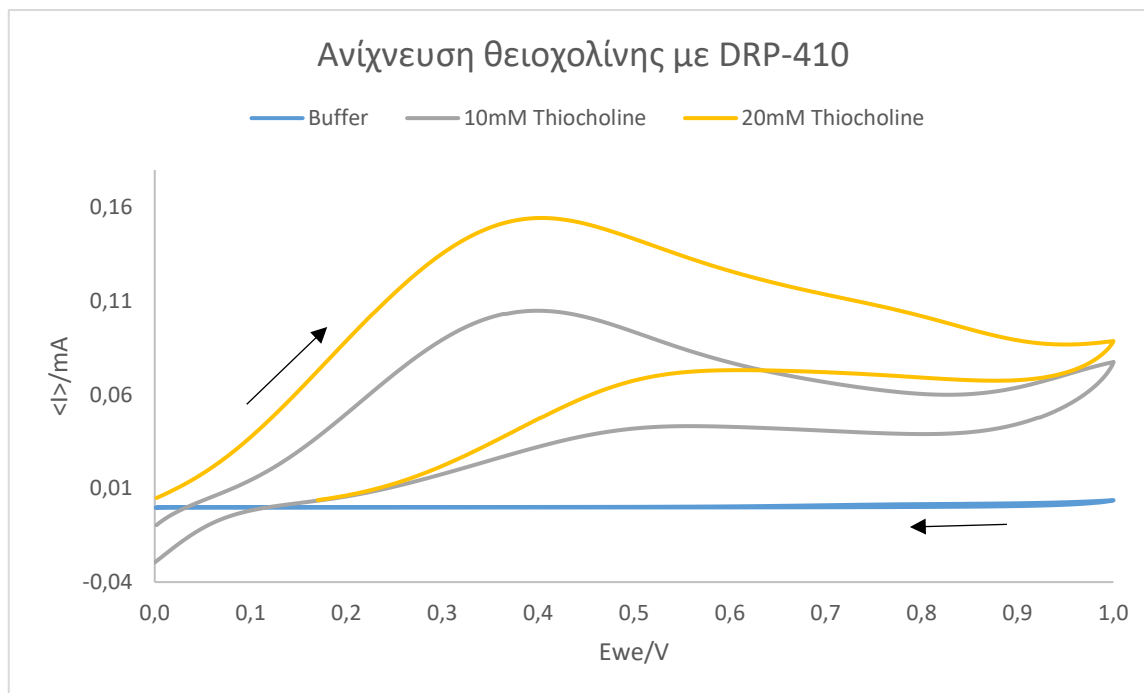
Συχνά στη βιβλιογραφία έχει έχουν χρησιμοποιηθεί ηλεκτρόδια άνθρακα τροποποιημένα με Cobalt Phthalocyanine, για την ηλεκτροχημική ανίχνευση

θειοχολίνης.(82) Στην παρούσα εργασία γι' αυτό το σκοπό χρησιμοποιήθηκαν τα screen printed ηλεκτρόδια DRP-410 της εταιρίας Dropsens.



Εικόνα 55: Ηλεκτρόδιο άνθρακα τροποποιημένο με Cobalt Phthalocyanine

Αρχικά, για τα ηλεκτρόδια άνθρακα τροποποιημένα με Cobalt Phthalocyanine, δεν εκτελέστηκε κάποιο πρωτόκολλο καθαρισμού. Πάνω στην επιφάνεια αρχικά, με πιπέτα τοποθετήθηκαν 50 mM Phosphate Buffer pH 7,4 με 0,1 M KCl και το ηλεκτρόδιο χαρακτηρίστηκε ως προς CV από [0,1]V. Έπειτα, αφού υπολογίστηκε με χρωματομετρία και με τη βοήθεια του νόμου Beer-Lambert (Εξίσωση 7) η συγκέντρωση της θειοχολίνης που προέκυψε ενζυματικά (20 mM αρχική συγκέντρωση), αραιώθηκε στα 10 και 5 mM αντίστοιχα. Έτσι, κάθε συγκέντρωση τοποθετήθηκε στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου και αυτό χαρακτηρίστηκε ως προς CV (Γράφημα 37).



Γράφημα 37: CVs για ηλεκτρόδιο DRP-410, με Phosphate Buffer 50 mM και με 10 και 20mM θειοχολίνη, με scan rate 50 mV/s

Στο Γράφημα 39, το σήμα που αποδίδει το Phosphate Buffer είναι αρκετά χαμηλό (περιοχή κοντά στα 0 μA), ενώ μεγάλη άνοδο παρουσιάζει η ενζυμικά παραγόμενη θειοχολίνη τόσο στα 10 mM (104 μA) όσο και στα 20 mM (154 μA) σε κοινό δυναμικό (0,4 V). Το παραγόμενο σήμα της οξειδωσης της θειοχολίνης μοιάζει να αυξάνεται ανάλογα με την αύξηση της συγκέντρωσής της, ενώ η συμπεριφορά του υπόλοιπου γραφήματος διατηρείται. Ενώ βιβλιογραφικά αναφέρεται πως η οξειδωσή της λαμβάνει χώρα σε χαμηλά δυναμικά ($\sim 0,1$ V) (83), στο Γράφημα 37 η ηλεκτροκαταλυτική οξειδωτική διαδικασία λαμβάνει χώρα στα 0,4 V.

5.4.4 Τροποποίηση με Carbon Black

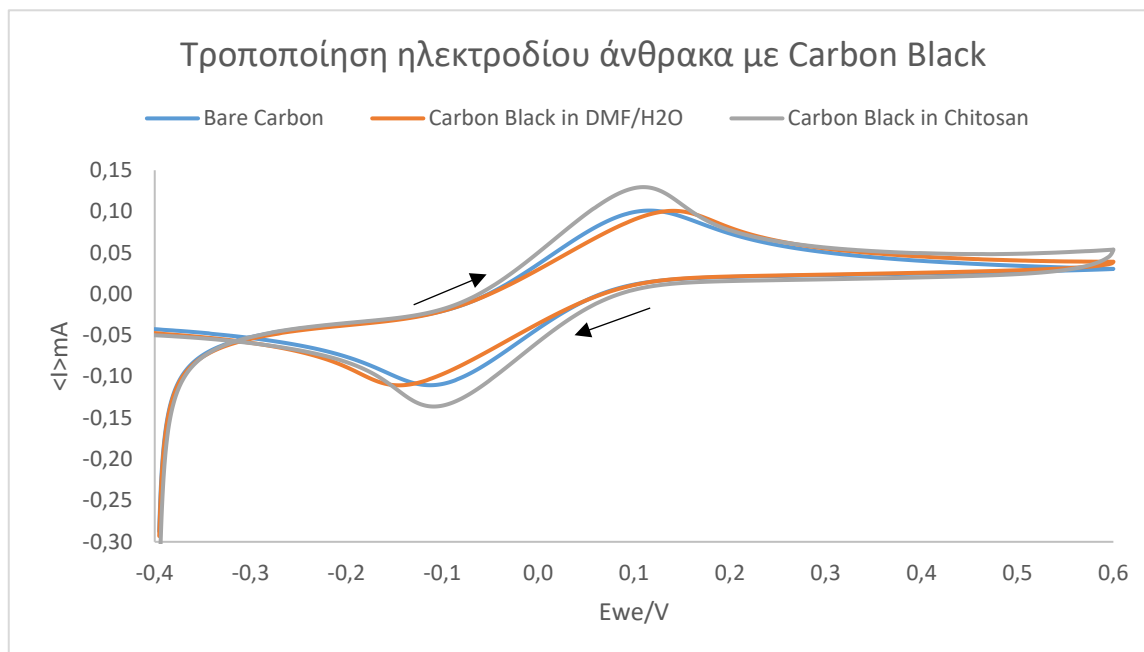
Πολύ συχνά, για την βελτιστοποίηση των ηλεκτροχημικών βιοαισθητήρων που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση φυτοφαρμάκων, έχουν χρησιμοποιηθεί τα νανοσωματίδια Carbon Black ως υλικά τροποποίησης της επιφάνειας των ηλεκτροδίων άνθρακα. Ένας από τους λόγους είναι η αύξηση της αγωγιμότητας της επιφάνειας κι επίσης

η δυνατότητα ανίχνευσης της θειοχολίνης σε χαμηλότερα δυναμικά. (74) Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν τα νανοσωματίδια τύπου VXC72R σε μορφή πούδρας της εταιρίας Cabot. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, δοκιμάστηκαν τα εξής πρωτόκολλα:

- a. 20 mg πούδρας νανοσωματιδίων Carbon Black σε 20 mL DMF σε νερό (1:1) για 1 ώρα sonication. Όταν το διάλυμα ομογενοποιήθηκε, 3 σταγόνες των 2 μL εναποτέθηκαν διαδοχικά με πιπέτα, αφού στέγνωσε η προηγούμενη, μόνο στην περιοχή εργασίας του ηλεκτροδίου άνθρακα. (73)
- b. 0,05% w/w Χιτοζάνη χαμηλού μοριακού βάρους εισήχθησαν σε υπό ανάδευση ζεστό υδατικό διάλυμα 0,05 M HCl τελικού όγκου 100 mL. Η θέρμανση του διαλύματος και η χρήση του HCl εξυπηρετεί στην καλύτερη διάλυση της χιτοζάνης. Έτσι, αφού ομογενοποιήθηκε το διάλυμα, αφέθηκε μέχρι να έρθει φυσικά σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα ρυθμίστηκε το pH του στο 5 χρησιμοποιώντας NaOH. Έπειτα, σε 10 mL αυτού του διαλύματος, προστέθηκαν 30 mg πούδρας Carbon Black και το τελικό διάλυμα αναδεύτηκε για αρκετή ώρα μέχρι να ομογενοποιηθεί. Τέλος, 2 μL από το τελικό διάλυμα εναποτέθηκαν πάνω στην περιοχή εργασίας του ηλεκτροδίου άνθρακα μέχρι να στεγνώσουν. (74)

Τέλος, τα δύο ηλεκτρόδια που προέκυψαν, μαζί με ένα σκέτο ηλεκτρόδιο άνθρακα (DRP-110), χαρακτηρίστηκαν ως προς τα CV τους σε 50 mM Phosphate Buffer pH 7,4 με 0,1 M KCl και 5mM Ferri/Ferro για την παρατήρηση των οξειδοαναγωγικών κορυφών. Τα αποτελέσματα του χαρακτηρισμού απεικονίζονται στο Γράφημα 38. Σύμφωνα με τα διαγράμματα που προκύπτουν, για το πρωτόκολλο (a) διαπιστώνεται ότι δε βελτιώνει την επιφάνεια ως προς την αγωγιμότητα, καθώς η ένταση του ρεύματος παραμένει ίδια και οι οξειδοαναγωγικές κορυφές απομακρύνονται μεταξύ τους. Αναφορικά, για το ατροποποίητο ηλεκτρόδιο το ΔE_p είναι 225 mV, ενώ για το τροποποιημένο με Carbon Black σε DMF/H₂O είναι 288 mV.

Αντίθετα, το πρωτόκολλο (b) διαπιστώνεται ότι βελτιώνει την αγωγιμότητα της επιφάνειας καθώς φτάνει μέχρι τα 130 μA έναντι του ατροποποίητου ηλεκτροδίου που φτάνει στα 96 μA περίπου. Επιπλέον, η απόσταση των οξειδοαναγωγικών κορυφών, ΔE_p στο τροποποιημένο ηλεκτρόδιο με Carbon Black σε χιτοζάνη είναι 214 mV έναντι των 225 mV του ατροποποίητου ηλεκτροδίου. Αυτό πιθανώς οφείλεται στο ότι η χιτοζάνη βοηθά στην καλύτερη διασπορά των νανοσωματιδίων Carbon Black μέσα στο πλέγμα. (74)



Γράφημα 38: CVs για το χαρακτηρισμό ενός ηλεκτροδίου DRP-110, ενός τροποποιημένου με Carbon Black σε DMF/H₂O και ενός τροποποιημένου με Carbon Black σε χιτοζάνη. Ο χαρακτηρισμός έγινε σε 5 mM K₃Fe(CN)₆ - K₄Fe(CN)₆ σε Phosphate Buffer με 0,1M KCl, με scan rate 50 mV/s

Επομένως, με βάση το Γράφημα 38, προτιμήθηκε η εφαρμογή του πρωτοκόλλου (b) σύμφωνα με το οποίο τα νανοδομημένα Carbon Black διαχέονται στο διάλυμα της χιτοζάνης. Παράλληλα, υπολογίστηκε η ενεργός επιφάνεια (A_{eff}) των δύο ηλεκτροδίων (σκέτο ηλεκτρόδιο άνθρακα και τροποποιημένο με CB σε χιτοζάνη) με τη βοήθεια της Εξίσωσης Randles-Sevcik:

$$I_{\text{pa}} = (2,687 \cdot 10^5) \cdot n^{3/2} \cdot \nu^{1/2} \cdot D^{1/2} \cdot A_{\text{eff}} \cdot C^0$$

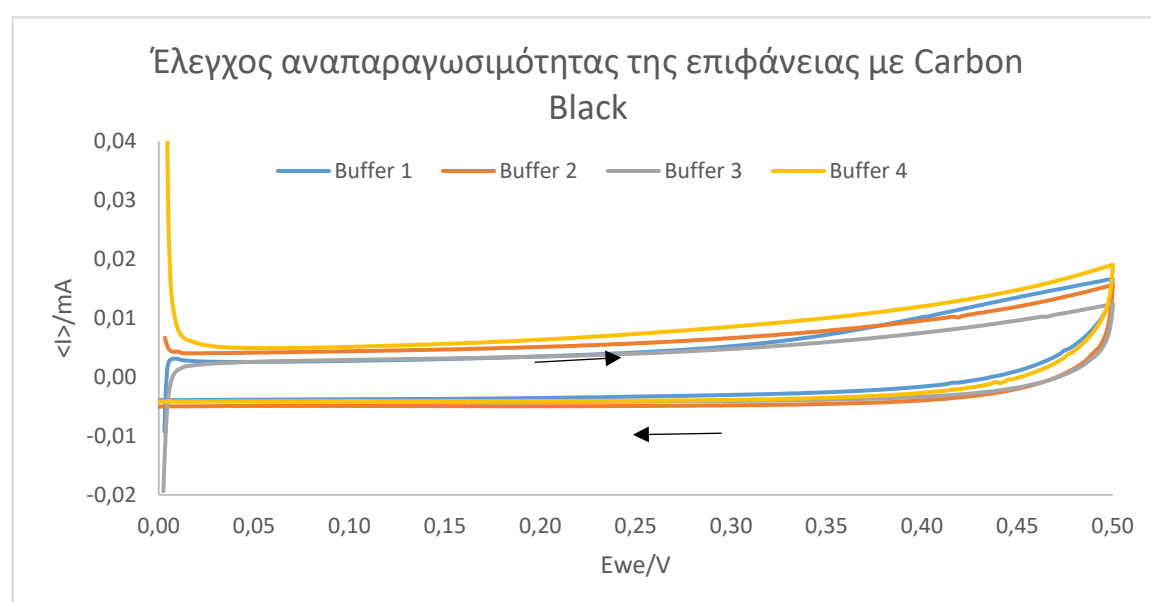
Εξίσωση 9: Εξίσωσης Randles-Sevcik για τον υπολογισμό της ενεργούς επιφάνειας A_{eff}

Όπου, I (A) το ανοδικό ρεύμα της οξειδωτικής κορυφής του κυκλικού βολταμμογραφήματος, n ο αριθμός των ηλεκτρονίων που μεταφέρονται κατά την οξειδωαναγωγή, ν (V/s) το scan rate της μέτρησης, D (cm²/s) ο συντελεστής διάχυσης για το οξειδωαναγωγικό ζεύγος K₃Fe(CN)₆ - K₄Fe(CN)₆, A_{eff} (cm²) η ενεργός επιφάνεια του ηλεκτροδίου και C^0 (mol/ cm³) η συγκέντρωση του K₃Fe(CN)₆ - K₄Fe(CN)₆. Όσον αφορά το D , η βιβλιογραφία αναφέρει πως για ένα τέτοιο οξειδωαναγωγικό σύστημα, ο συντελεστής διάχυσης της οξείδωσης είναι 0,76*10⁻⁵ cm²/s. (97)(99)

Όμως, σύμφωνα με τον Κοπορκα και τους συνεργάτες του (98), δείχθηκε πως ο συντελεστής διάχυσης επηρεάζεται άμεσα από τη συγκέντρωση των $K_3Fe(CN)_6$ και $K_4Fe(CN)_6$. Επομένως, στην περίπτωση των 5 mM οξειδωαναγωγικού ζεύγους, η τιμή του συντελεστή προκύπτει να είναι $0,46 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ και όλοι οι υπολογισμοί πραγματοποιήθηκαν με αυτή. Για το ατροποποίητο ηλεκτρόδιο άνθρακα η ενεργός επιφάνεια υπολογίστηκε στα $0,143 \text{ cm}^2$ και για το τροποποιημένο στα $0,225 \text{ cm}^2$. Η αντίστοιχη γεωμετρική επιφάνεια και των δύο είναι $0,1256 \text{ cm}^2$.

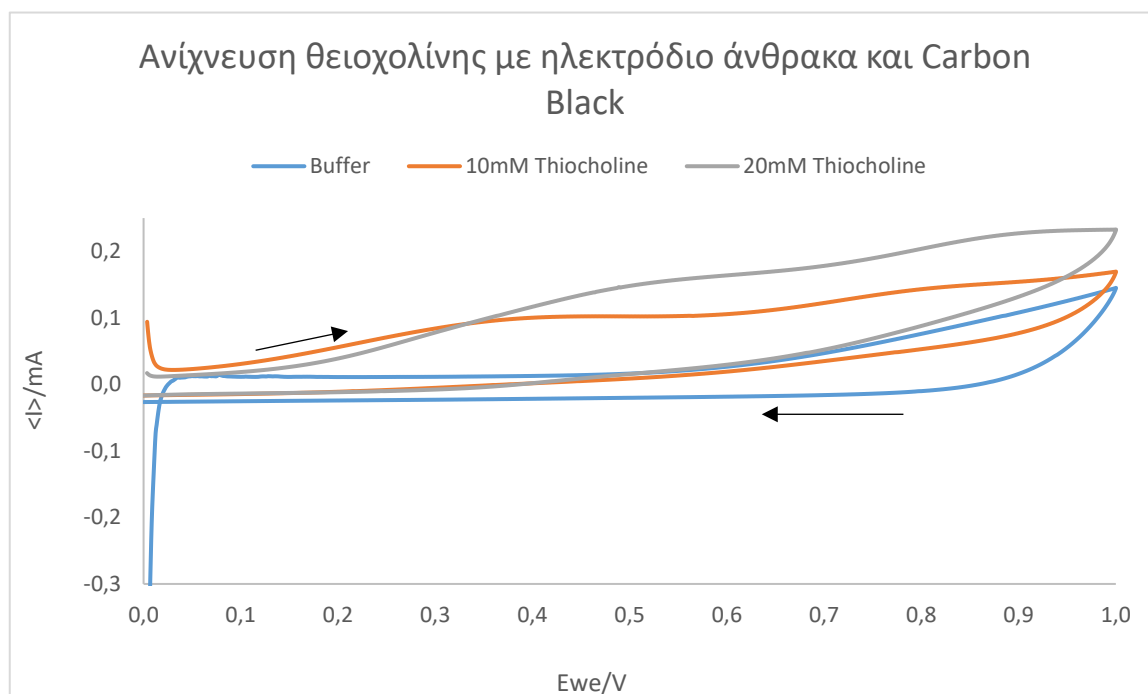
Στο επόμενο στάδιο, κρίθηκε αναγκαίος ο έλεγχος της αναπαραγωγιμοσύνης της τροποποίησης της επιφάνειας άνθρακα με αυτό το πρωτόκολλο, γι' αυτό επαναλήφθηκε σε 4 νέα ηλεκτρόδια ακριβώς με τον ίδιο τρόπο. Μετά την τροποποίηση, χαρακτηρίστηκαν με 50 mM Phosphate Buffer pH 7,4 για τον έλεγχο της σταθερότητας του παραγόμενου στρώματος χιτοζάνης με Carbon Black.

Από το Γράφημα 39, διαπιστώνεται πως οι επιφάνειες έχουν τροποποιηθεί με τον ίδιο τρόπο και τα σήματα που προκύπτουν είναι παραπλήσια μεταξύ τους ως προς την ένταση του ρεύματος και τη συμπεριφορά. Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα, ότι μπορεί πλέον να εξετασθεί η δυνατότητα ανίχνευσης της οξείδωσης της θειοχολίνης που παράγεται ενζυμικά και αφού υπολογίστηκε η συγκέντρωσή της (10 και 20 mM) με τη βοήθεια του νόμου Beer-Lambert (Εξίσωση 7) εναποτέθηκε σε ένα τροποποιημένο ηλεκτρόδιο. Πρώτα ελέγχθηκε η απόκριση της τροποποιημένης επιφάνειας σε 50 mM Phosphate Buffer pH 7,4 + 0,1 M KCl. (Γράφημα 40)



Γράφημα 39: CVs για 4 ηλεκτρόδια άνθρακα τροποποιημένα με Carbon Black σε χιτοζάνη, χαρακτηρισμένα με 50 mM Phosphate Buffer, με scan rate 50 mV/s

Από το Γράφημα 40, παρατηρείται η συνολική αύξηση της αγωγιμότητας της επιφάνειας του ηλεκτροδίου. Το διάγραμμα του Phosphate Buffer είναι χαμηλό μέχρι τα 600 mV, ενώ μέχρι το 1 V παρουσιάζεται αύξηση του σήματος, που πιθανώς οφείλεται στην παρουσία των αλάτων. Ύστερα, με την προσθήκη του διαλύματος των 10mM θειοχολίνης, παρατηρείται ο σχηματισμός μια οξειδωτικής κορυφής κοντά στα 400 mV με απόκριση 116 μA , πέρα από τη συνολική αύξηση του σήματος του διαγράμματος (πορτοκαλί γραμμή). Με την αύξηση της συγκέντρωσης της θειοχολίνης στα 20 mM, εκτός από την περαιτέρω αύξηση του σήματος με ταυτόχρονη διατήρηση της συμπεριφοράς, παρατηρείται μετατόπιση της οξειδωτικής κορυφής κοντά στα 500 mV με απόκριση 151 μA (γκρι γραμμή).



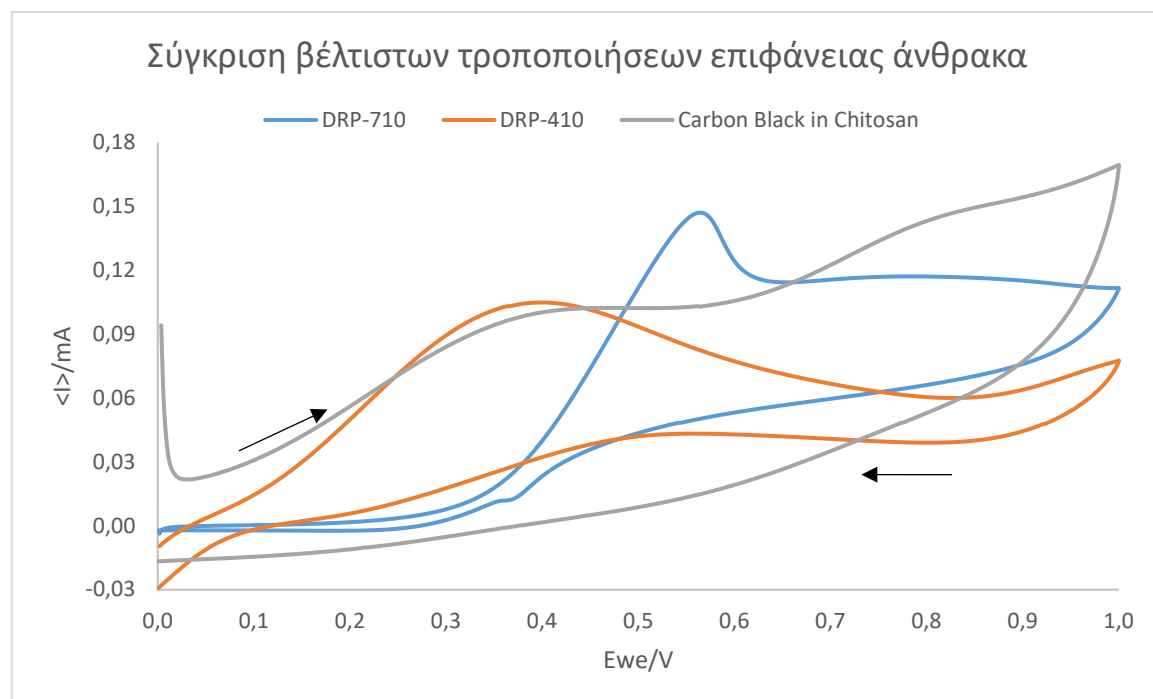
Γράφημα 40: CVs για ηλεκτρόδιο άνθρακα τροποποιημένο με Carbon Black σε χιτοζάνη, με Phosphate Buffer 50 mM + 0,1M KCl και με 10 και 20 mM θειοχολίνη, με scan rate 50 mV/s

5.5 Σύγκριση των τροποποιημένων επιφανειών άνθρακα

5.5.1 Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων τροποποίησης

Στις προηγούμενες υποενότητες αναφέρθηκαν οι τροποποιήσεις που εξετάστηκαν με βάση τη βιβλιογραφία πάνω στην επιφάνεια screen printed ηλεκτροδίων άνθρακα. Από το Γράφημα 34 με την τροποποίηση του ηλεκτροδίου με νανοσωματίδια μαγνητήτη μέσα σε δίκτυο χιτοζάνης, προκύπτει πως αυτή η τεχνική δεν είναι κατάλληλη για την ευαισθησία στην ανίχνευση της οξειδωσης της θειοχολίνης. Έπειτα, σχετικά με την τροποποίηση με Prussian Blue, παρατηρήθηκε πως η χημική του σύνθεση και η τροποποίηση της επιφάνειας με αυτό δεν παρέχει αναπαραγωγίσιμα αποτελέσματα (Γράφημα 34 και Γράφημα 35).

Αντίθετα, από το Γράφημα 38, διαπιστώνεται πως τα εμπορικά διαθέσιμα ηλεκτρόδια άνθρακα τροποποιημένα με Prussian Blue (DRP-710), της εταιρίας Dropsens, παρέχουν μεγαλύτερη ευαισθησία ως προς την ανίχνευση της θειοχολίνης ενώ ταυτόχρονα λύνουν το πρόβλημα της αναπαραγωγιμότητας. Επιπλέον και τα εμπορικά διαθέσιμα ηλεκτρόδια άνθρακα τροποποιημένα με Cobalt Phthalocyanine (DRP-410) αποδεικνύουν πως η ανίχνευση της θειοχολίνης μπορεί να πραγματοποιηθεί σε χαμηλά δυναμικά και με καλή ευαισθησία (Γράφημα 37). Τέλος, η χρήση των νανοσωματιδίων Carbon Black μέσα σε διάλυμα χιτοζάνης, φαίνεται μια ακόμη αξιόλογη και αναπαραγωγίσιμη λύση (Γράφημα 39) τόσο για την αύξηση της αγωγιμότητας (Γράφημα 38), όσο και για την ανίχνευση της θειοχολίνης (Γράφημα 40).



Γράφημα 41: CVs για ηλεκτρόδια άνθρακα τροποποιημένα με Prussian Blue και Co-Phthalocyanine από τη Dropsens και με χημική σύνθεση Carbon Black σε χιτοζάνη. Ανίχνευση 10 mM θειοχολίνης με scan rate 50 mV/s

Στο Γράφημα 41, απεικονίζεται η σύγκριση της ανίχνευσης 10 mM θειοχολίνης που παράχθηκε ενζυμικά σε κάθε τροποποιημένη επιφάνεια άνθρακα. Παρατηρείται πως κάθε επιφάνεια, ανάλογα με το υλικό με το οποίο έχει τροποποιηθεί, παρουσιάζει και διαφορετική συμπεριφορά. Και οι τρεις τεχνικές τροποποίησης παρέχουν υψηλού ρεύματος σήματα και ευδιάκριτες κορυφές για την οξείδωση της θειοχολίνης. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα.

	<i>DRP-710</i>	<i>DRP-410</i>	<i>Carbon Black</i>
<i>Δυναμικό κορυφής</i>	569 mV	396 mV	428 mV
<i>Ρεύμα κορυφής</i>	146 μ A	104 μ A	101 μ A

Πίνακας 7: Σύγκριση κορυφών οξείδωσης για κάθε μέσο τροποποίησης της επιφάνειας

Τα αποτελέσματα του DRP-710 με Prussian Blue, διαφέρουν αρκετά από αυτά των άλλων δύο ηλεκτροδίων για την ανίχνευση των 10mM θειοχολίνης. Το δυναμικό που απαιτείται να εφαρμοστεί στην επιφάνεια με Prussian Blue για την οξείδωση της ουσίας είναι αρκετά ψηλότερο από τα δυναμικά που απαιτούνται στην επιφάνεια με Carbon Black και Co-Phthalocyanine αντίστοιχα. Βέβαια, η ένταση του ρεύματος της κορυφής είναι μεγαλύτερη από τις εντάσεις που ανιχνεύεται η θειοχολίνη με τα άλλα δύο υλικά.

Από την άλλη πλευρά, τα αποτελέσματα της τροποποίησης των επιφανειών των ηλεκτροδίων με Carbon Black και Co-Phthalocyanine πλησιάζουν αρκετά μεταξύ τους. Επομένως, για την περαιτέρω αξιολόγηση των τροποποιήσεων των επιφανειών με τα τρία υλικά, κρίνεται αναγκαία η ακινητοποίηση ενζύμου πάνω στις επιφάνειες με στόχο την ανίχνευση της θειοχολίνης που παράγεται πάνω στην κάθε τροποποιημένη επιφάνεια.

5.5.2 Εναπόθεση ενζύμου στις τροποποιημένες επιφάνειες

Όπως αναφέρθηκε και στο τέλος της προηγούμενης υποενότητας, για την επιλογή της βέλτιστης τροποποίησης της επιφάνειας άνθρακα με τα διαθέσιμα νανοϋλικά, ακινητοποιήθηκε ένζυμο (AChE), ώστε να διαπιστωθεί ποιά τροποποίηση είναι πιο ευαίσθητη στην ανίχνευση της οξείδωσης της θειοχολίνης, η οποία παράγεται πλέον πάνω στην επιφάνεια από το ακινητοποιημένο ένζυμο.

Έτσι, σε ένα ηλεκτρόδιο DRP-710, σε ένα DRP-410 και σε ένα DRP-110 τροποποιημένο με Carbon Black σε χιτοζάνη, ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

- 2 μL Γλουταραλδεΐδη 0,25% διαλυμένη σε νερό, εναποτέθηκαν μόνο στην περιοχή εργασίας των τριών ηλεκτροδίων και αφέθηκαν να στεγνώσουν.
- Κατασκευή μίγματος μέσα στο οποίο εμπεριέχεται και το ένζυμο. 25 μL από 3% BSA σε νερό, 25 μL από 0,1% Nafion σε νερό και 25 μL από 33 U/mL (τελική συγκέντρωση) του ενζύμου, αναμίχθηκαν σε ένα tube και ανακινίστηκαν με vortex. Το ένζυμο ήταν διαλυμένο σε 50 mM Phosphate Buffer + 0,1 M KCl και με pH 7,4. Το pH, όπως και η θερμοκρασία, παίζουν σημαντικό ρόλο στη μέγιστη δραστικότητα του ενζύμου. (74)
- Στην πλέον στεγνή επιφάνεια των ηλεκτροδίων με γλουταραλδεΐδη, τοποθετήθηκαν 2 μL του μίγματος ενζύμου και αφέθηκαν να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου. (68)(73)(82)

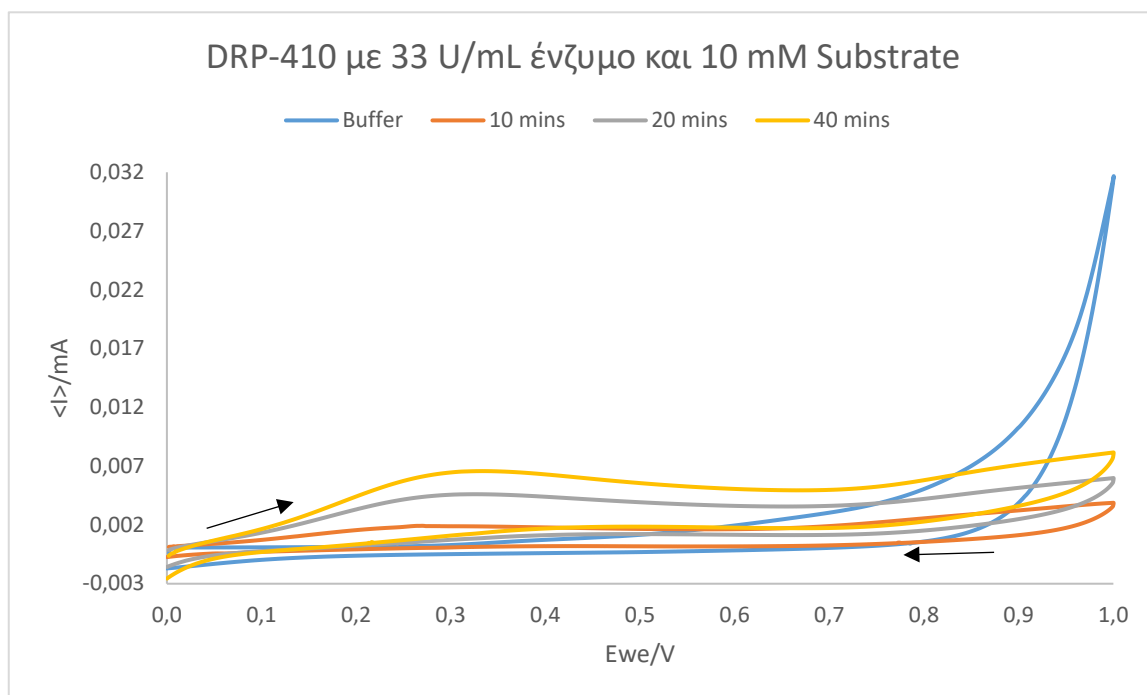
Σε αυτό το σημείο, κρίνεται αναγκαίο να αναφερθεί ο λόγος που χρησιμοποιήθηκε η BSA και το Nafion στο μίγμα του ενζύμου. Αρχικά, ο ρόλος της BSA σύμφωνα με τη βιβλιογραφία είναι διπλός. Αρχικά η προσθήκη της BSA μαζί με το ένζυμο, είναι απαραίτητη, για να βελτιωθεί η ακινητοποίηση του ενζύμου πάνω στην επιφάνεια, καθώς διαθέτει περισσότερες αμινομάδες συγκριτικά με την AChE. Με αυτόν τον τρόπο, σταθεροποιεί το μίγμα σχηματίζοντας ομοιοπολικούς δεσμούς με την επιφάνεια. Ο δεύτερος λόγος αφορά τη βελτίωση της διάρκειας ζωής του ενζύμου πάνω στην επιφάνεια.

Επιπλέον, το Nafion δρα ως αγώγιμο υλικό μέσω του οποίου ενισχύονται οι σταυροδεσμοί, επομένως χρησιμοποιείται για την προσκόλληση της μεμβράνης που περιέχει το ένζυμο πάνω στην επιφάνεια, αλλά και για την ενίσχυση που επιφέρει στη μεταφορά ηλεκτρονίων. (82)

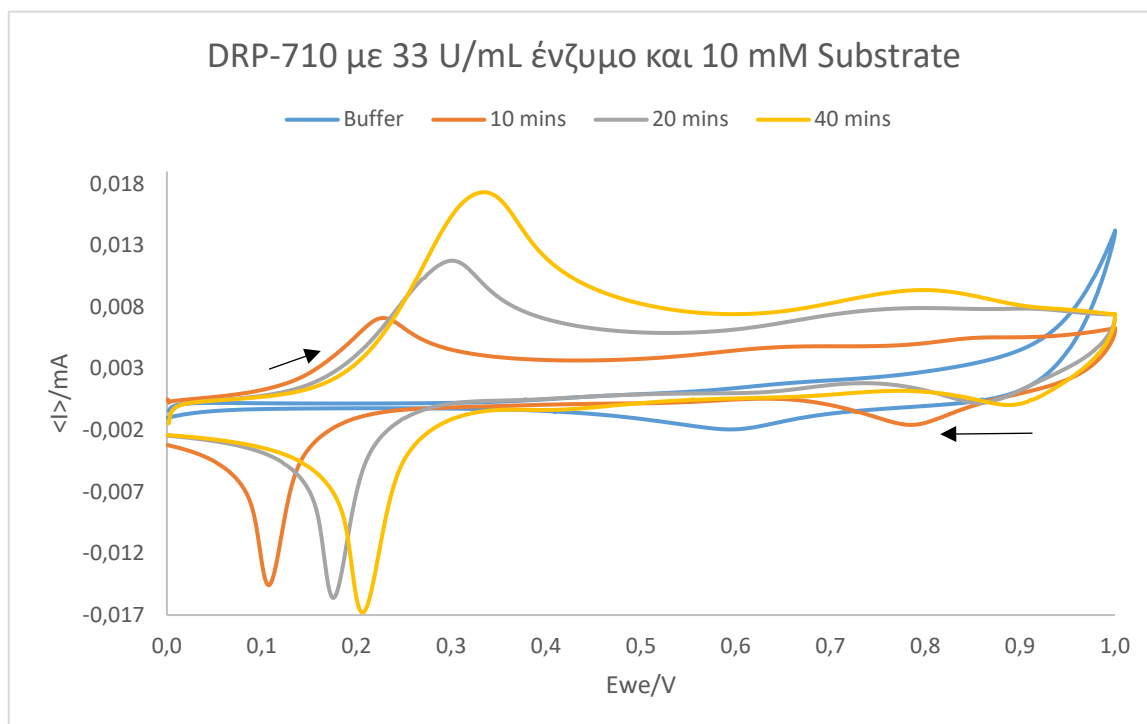
- Σε κάθε τροποποιημένο ηλεκτρόδιο, τοποθετήθηκαν 10 mM υποστρώματος και λήφθηκαν τα αντίστοιχα CV για 0,10,20 και 40 λεπτά.

Στο Γράφημα 44, απεικονίζεται γραφικά η ανίχνευση της θειοχολίνης σε ηλεκτρόδιο άνθρακα με Cobalt-Phthalocyanine (DRP-410) στους διάφορους χρόνους. Παρατηρείται πως ακόμη και στα 10' ανιχνεύεται η οξειδωση της θειοχολίνης κοντά στα 0,25 V, παρόλο που το σήμα είναι αρκετά χαμηλό στα 1,9 μA . Στους μεγαλύτερους χρόνους που θεωρητικά η συγκέντρωση της θειοχολίνης αυξάνεται, από τη μία αυξάνεται το ρεύμα των

σημάτων, από την άλλη μετατοπίζεται η κορυφή προς μεγαλύτερα δυναμικά, σε αντίθεση με το Γράφημα 37 που δεν είχε ακινητοποιημένο ένζυμο στην επιφάνεια.



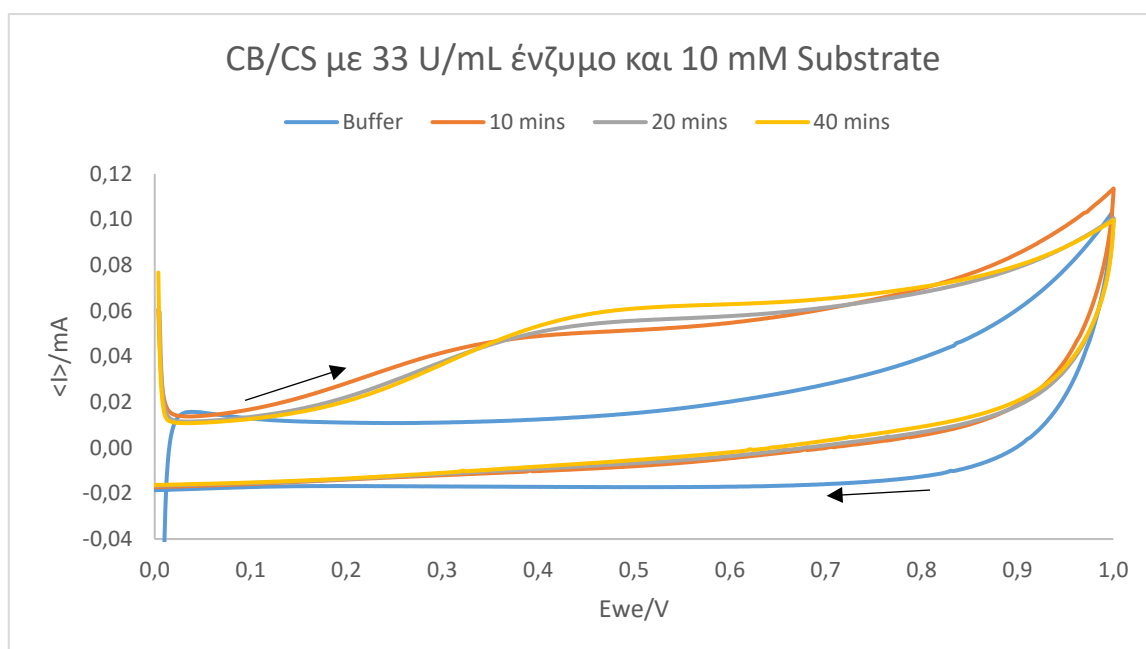
Γράφημα 42: CV για το DRP-410 με 100 U/mL AChE και 10mM Substrate για 10,20 και 40 λεπτά, scan rate 50 mV/s



Γράφημα 43: CV για το DRP-710 με 100 U/mL AChE και 10mM Substrate για 10,20 και 40 λεπτά, scan rate 50 mV/s

Στο Γράφημα 43, απεικονίζεται γραφικά η ανίχνευση της θειοχολίνης σε ηλεκτρόδιο άνθρακα με Prussian Blue (DRP-710) με το ένζυμο στους διάφορους χρόνους. Σε αυτό το είδος τροποποίησης της επιφάνειας είναι ακόμη πιο ευδιάκριτη η μετατόπιση της κορυφής της θειοχολίνης προς μεγαλύτερα δυναμικά με την αύξηση του χρόνου αλλά και πιθανώς την αύξηση της συγκέντρωσης της θειοχολίνης. Στα πρώτα 10' η κορυφή εντοπίζεται στα 0,23 V με ύψος 6,6 μA , στα 20' εντοπίζεται στα 0,3 V με ύψος 11,7 μA και στα 40' εντοπίζεται στα 0,34 V με ύψος 17,3 μA .

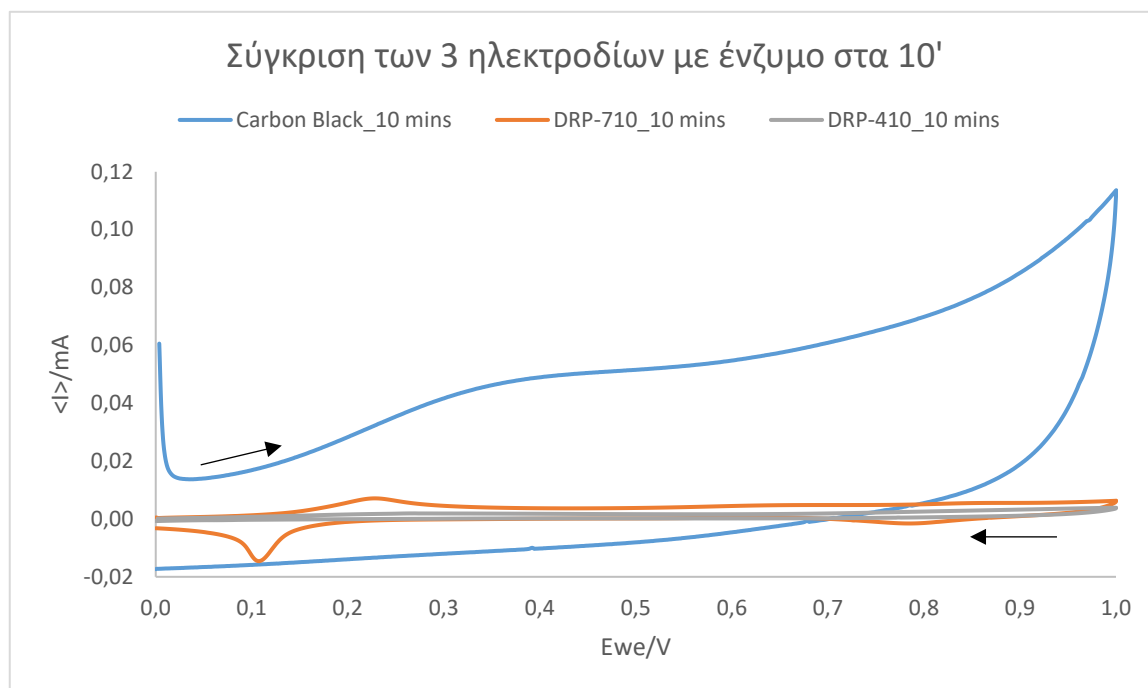
Συνεπώς, παρατηρείται μία αστάθεια ως προς την ανίχνευση της θειοχολίνης με εν γένει χαμηλά σήματα.



Γράφημα 44: CV για το τροποποιημένο με CB/CS ηλεκτρόδιο άνθρακα με 100 U/mL AChE και 10mM Substrate για 10,20 και 40 λεπτά, scan rate 50 mV/s

Στο Γράφημα 44, απεικονίζεται γραφικά η ανίχνευση της θειοχολίνης σε τροποποιημένο ηλεκτρόδιο άνθρακα με Carbon Black σε χιτοζάνη, με το ένζυμο στους διάφορους χρόνους. Μια πολύ σημαντική διαφορά σε σχέση με τα δύο προηγούμενα γραφήματα, είναι τα ψηλά ρεύματα ανίχνευσης της οξειδωσίας της θειοχολίνης. Στα πρώτα 10' η κορυφή εντοπίζεται στα 0,35V με ύψος 40 μA . Βέβαια και με αυτή την τροποποίηση της επιφάνειας παρατηρείται μικρή μετατόπιση της κορυφής με την πάροδο του χρόνου, αλλά αρκετά μικρότερη συγκριτικά με τις άλλες δύο τροποποιήσεις.

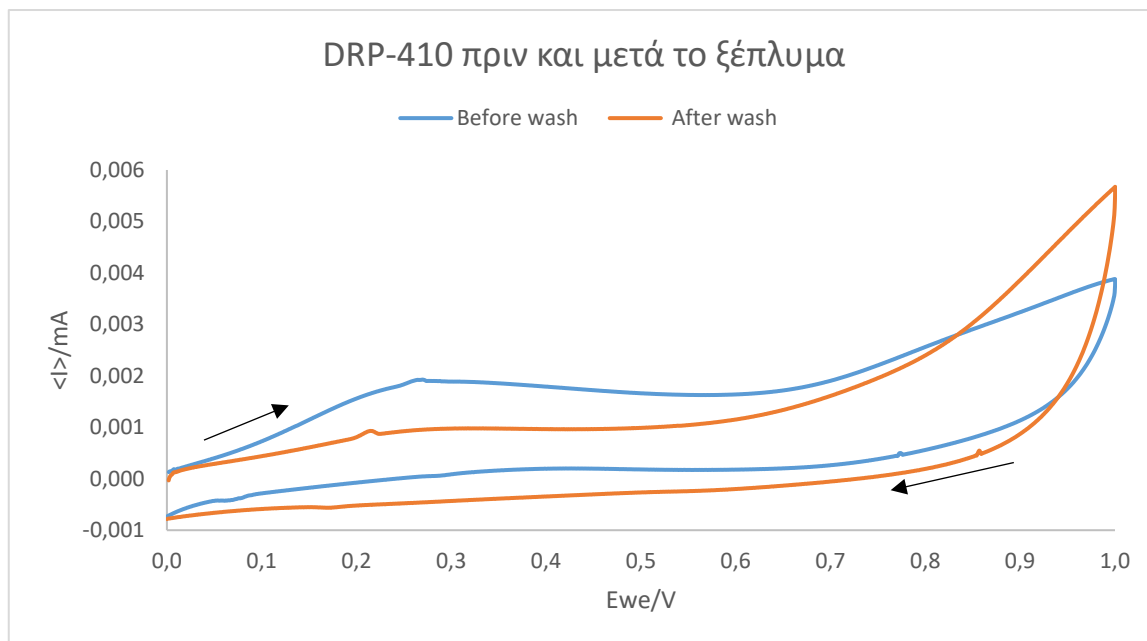
Συνοπτικά, για τα 10' παρουσιάζονται τα διαγράμματα ανίχνευσης της θειοχολίνης με 33 U/mL ενζύμου σε κάθε τροποποιημένο ηλεκτρόδιο στο παρακάτω γράφημα.



Γράφημα 45: CV για τα τροποποιημένα ηλεκτρόδια άνθρακα DRP-410, DRP-710 και CB/CS με 100 U/mL AChE και 10mM Substrate για 10', scan rate 50 mV/s

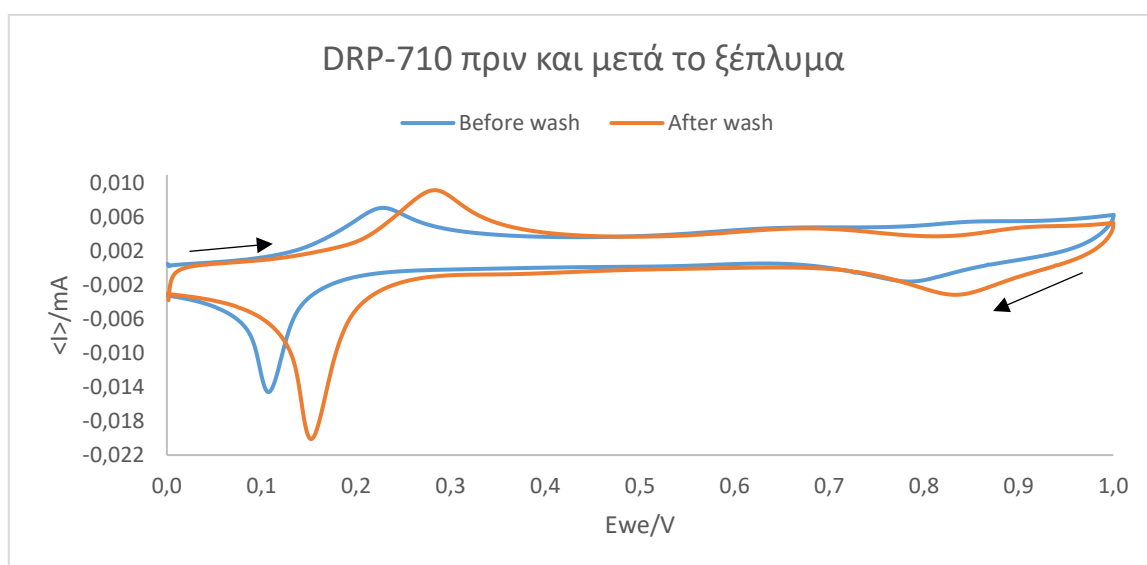
Από το Γράφημα 45, φαίνεται η ενζυμικά παραγόμενη θειοχολίνη στα 10 πρώτα λεπτά από 10 mM υποστρώματος (acetylthiocholine chloride) για τα 3 τροποποιημένα ηλεκτρόδια που εξετάστηκαν παραπάνω. Είναι ξεκάθαρη η αυξημένη αγωγιμότητα που παρουσιάζει η επιφάνεια με Carbon Black σε χιτοζάνη, έναντι της τροποποίησης με Prussian Blue και Cobalt-Phthalocyanine.

Τέλος, δοκιμάστηκε το ξέπλυμα των 3 επιφανειών με 1mL 50 mM Phosphate Buffer + 0,1 M KCl και pH 7,4 και η επανατοποθέτηση 10 mM υποστρώματος (acetylthiocholine chloride) μόνο για 10'. Στόχος αυτής της δοκιμής ήταν η μελέτη της σταθερότητας του στρώματος με το ακινητοποιημένο ένζυμο πάνω στην επιφάνεια των ηλεκτροδίων.



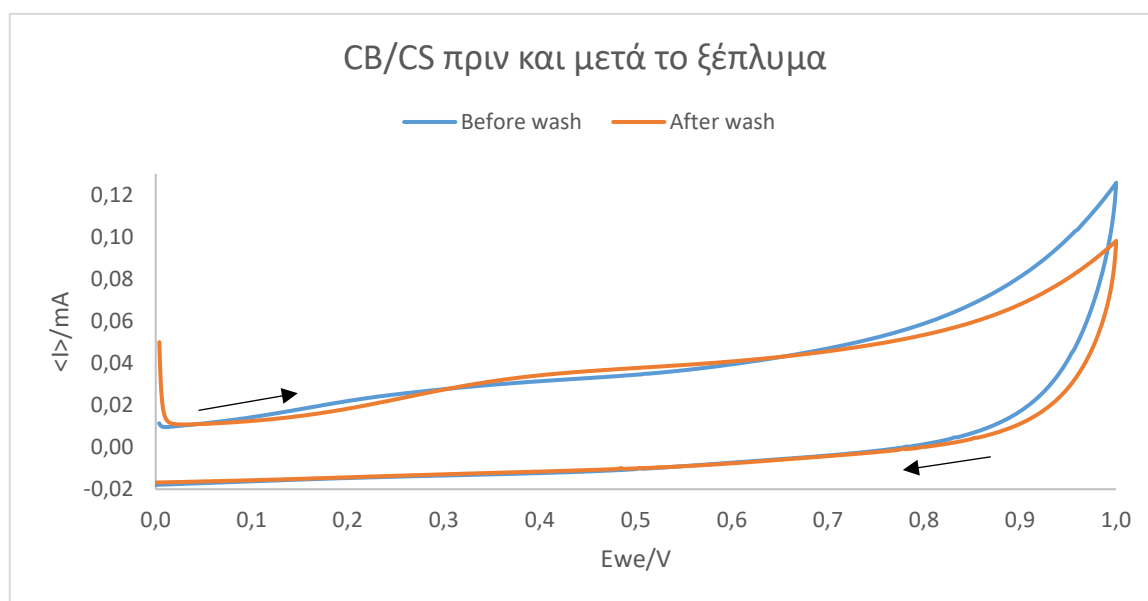
Γράφημα 46: CV για το ηλεκτρόδιο άνθρακα DRP-410 με 33 U/mL AChE, πριν και μετά το ξέπλυμα με Phosphate Buffer και μέτρηση με 10 mM υποστρώματος στα 10', με scan rate 50 mV/s

Όπως φαίνεται στο Γράφημα 46, το σήμα που προκύπτει μετά το ξέπλυμα είναι πολύ χαμηλό, επομένως θεωρήθηκε ότι το στρώμα του ενζύμου σε μεγάλο βαθμό έφυγε από την επιφάνεια καθώς δεν ήταν ακινητοποιημένο σε κάποιο σταθερό πλέγμα. Επομένως, τα ηλεκτρόδια DRP-410 δε μπορούν να χρησιμοποιηθούν όπως είναι για την ακινητοποίηση του ενζύμου στην επιφάνεια με στόχο την ανίχνευση της θειοχολίνης.



Γράφημα 47: CV για το ηλεκτρόδιο άνθρακα DRP-710 με 33 U/mL AChE, πριν και μετά το ξέπλυμα με Phosphate Buffer και μέτρηση με 10 mM υποστρώματος στα 10', με scan rate 50 mV/s

Αντίθετα, από το Γράφημα 47, προκύπτει το συμπέρασμα ότι το ένζυμο δεν ξεπλένεται στο ηλεκτρόδιο DRP-710 όπως στο DRP-410, αλλά παρατηρείται μια περίεργη συμπεριφορά, καθώς οι οξειδωαναγωγικές κορυφές μετατοπίζονται προς μεγαλύτερα δυναμικά και ανιχνεύονται σε λίγο πιο ψηλά ρεύματα μετά το ξέπλυμα σε αντίθεση με πριν, παρόλο που η συγκέντρωση του υποστρώματος παραμένει σταθερή. Λόγω της αστάθειας που παρουσιάζουν τα ηλεκτρόδια DRP-710 ως προς την ανίχνευση της οξείδωσης της θειοχολίνης δε μπορούν να χρησιμοποιηθούν για περαιτέρω μελέτες.



Γράφημα 48: CV για το τροποποιημένο ηλεκτρόδιο άνθρακα με CB σε χιτοζάνη, με 33 U/mL AChE, πριν και μετά το ξέπλυμα με Phosphate Buffer και μέτρηση με 10 mM υποστρώματος στα 10', με scan rate 50 mV/s

Στο Γράφημα 48, παρουσιάζεται η ανίχνευση της οξείδωσης της θειοχολίνης πριν και μετά το ξέπλυμα με Phosphate Buffer. Παρατηρείται πως ανεξάρτητα του ξεπλύματος της επιφάνειας, η ανίχνευση της θειοχολίνης πραγματοποιείται για τα 10' στο ίδιο δυναμικό και με ίδια ένταση ρεύματος. Επομένως, η τροποποίηση των επιφανειών των ηλεκτροδίων άνθρακα με Carbon Black σε δίκτυο χιτοζάνης κρίνεται ο καταλληλότερος τρόπος να τροποποιηθούν οι επιφάνειες τόσο για την επίτευξη υψηλής αγωγιμότητας, αλλά και για την διασφάλιση της ακινητοποίησης του ενζύμου πάνω στην επιφάνεια για ακριβή ανίχνευση της θειοχολίνης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΧΗΜΙΚΗΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗΣ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΩΝ ΑΝΘΡΑΚΑ ΜΕ CARBON BLACK

Στην προηγούμενη ενότητα, μελετήθηκε η τροποποίηση της επιφάνειας screen printed ηλεκτροδίων άνθρακα με νανοσωματίδια Carbon Black ομογενοποιημένα σε διάλυμα Χιτοζάνης. Αυτή η μέθοδος τροποποίησης, κρίθηκε κατάλληλη για τη συνέχεια των πειραμάτων προς την ανίχνευση της οξείδωσης της θειοχολίνης σε χαμηλά δυναμικά και με υψηλού ρεύματος σήματα.

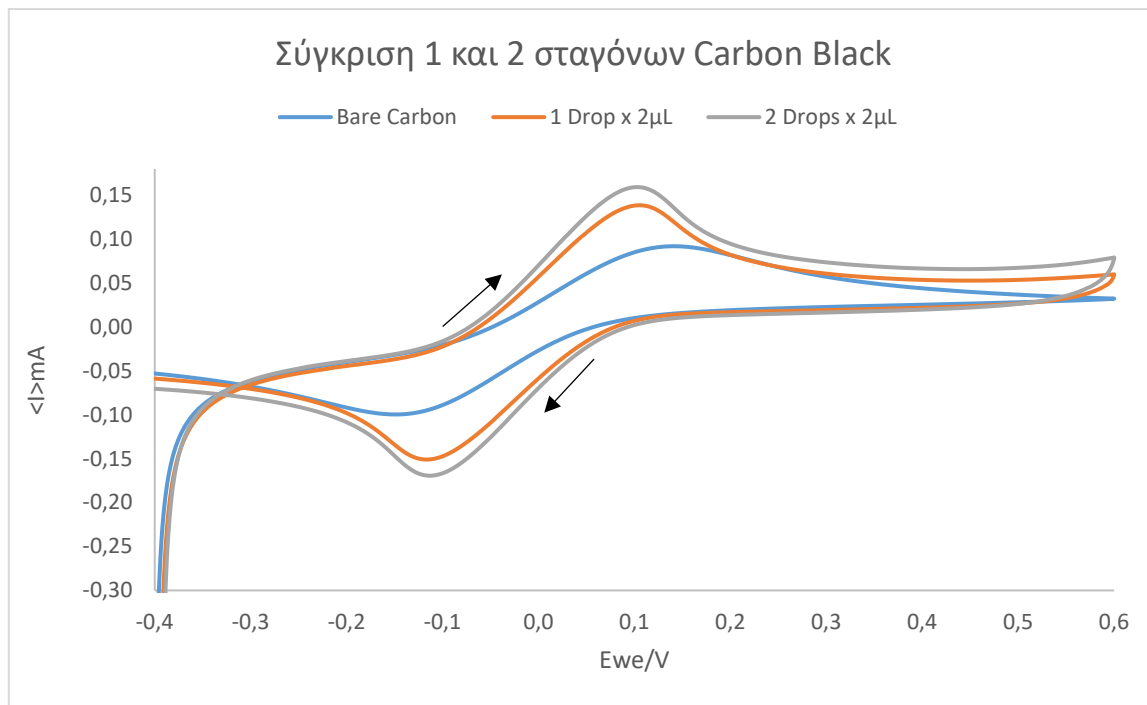
6.1 Ποσότητα Carbon Black στο ηλεκτρόδιο

Στην προσπάθεια να αυξηθεί η αγωγιμότητα της επιφάνειας του άνθρακα όσο το δυνατόν περισσότερο, διαφοροποιήθηκε ελαφρώς το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε για την εναπόθεση των νανοσωματιδίων Carbon Black μέσα σε Χιτοζάνη. (74) Σε αυτό το μέρος του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν ηλεκτρόδια DRP-110 και DRP-C11L, καθώς παρουσίαζαν πολλές ομοιότητες κατά τον χαρακτηρισμό τους με 5 mM $K_3Fe(CN)_6$ - $K_4Fe(CN)_6$ σε 1x PBS.

Σαν αρχική δοκιμή, χρησιμοποιήθηκε ένα ηλεκτρόδιο άνθρακα το οποίο τροποποιήθηκε με 1 σταγόνα των 2 μ L CB/CS (Carbon Black σε χιτοζάνη) και ένα ηλεκτρόδιο άνθρακα το οποίο τροποποιήθηκε με 2 σταγόνες των 2 μ L CB/CS. Να σημειωθεί ότι για να τοποθετηθεί η δεύτερη σταγόνα, είχε στεγνώσει καλά η πρώτη. Έπειτα, τα δύο αυτά ηλεκτρόδια μαζί με ένα ατροποποίητο, χαρακτηρίστηκαν με CV με 5 mM $K_3Fe(CN)_6$ - $K_4Fe(CN)_6$ σε 1x PBS ώστε να ελεγχθεί η αγωγιμότητα των επιφανειών.

Όπως φαίνεται στο Γράφημα 49, η τροποποίηση τόσο με μία σταγόνα όσο και με δύο βελτιώνουν κατά πολύ την αγωγιμότητα του αρχικού ηλεκτροδίου, καθώς οι οξειδοαναγωγικές κορυφές οξύνονται και πλησιάζουν μεταξύ τους σε σχέση με το ατροποποίητο ηλεκτρόδιο. Παρόλα αυτά, παρατηρείται περαιτέρω βελτίωση της αγωγιμότητας με την εναπόθεση και της δεύτερης σταγόνας CB/CS. Πιο συγκεκριμένα, με εναπόθεση μίας σταγόνας, το σήμα φτάνει στα 138 μ A έναντι των 92 μ A (κορυφή οξείδωσης) του ατροποποίητου ηλεκτροδίου. Με την εναπόθεση και της δεύτερης

σταγόνας το σήμα φτάνει στα 160 μA (κορυφή οξείδωσης). Κατά συνέπεια, η ενεργός επιφάνεια του ηλεκτροδίου υπολογίζεται στα 0,1932 cm^2 , ενώ με την εναπόθεση της μιας σταγόνας ήταν 0,1751 cm^2 . (Εξίσωση 9)

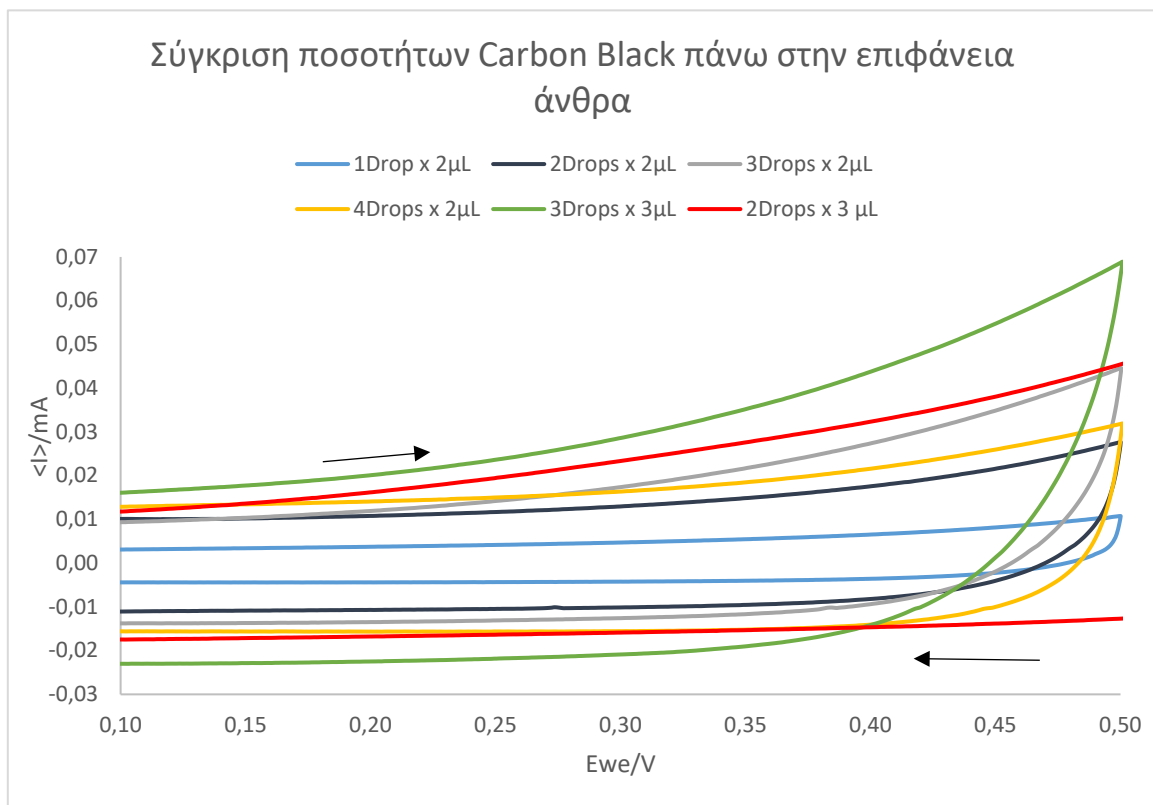


Γράφημα 49: CVs για το χαρακτηρισμό ενός ηλεκτροδίου DRP-110, ενός τροποποιημένου με 1 σταγόνα 2 μL Carbon Black σε χιτοζάνη και ενός τροποποιημένου με 2 σταγόνες 2 μL Carbon Black σε χιτοζάνη. Ο χαρακτηρισμός έγινε σε 5 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6 - \text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ σε 1xPBS με 0,1M KCl, scan rate 50 mV/s

Έπειτα, δοκιμάστηκαν και άλλες ποσότητες εναπόθεσης CB/CS και χαρακτηρίστηκαν με 50 mM Phosphate Buffer pH 7,4 + 0,1M KCl. Στο Γράφημα 50, παρουσιάζονται τα CVs των 4 ηλεκτροδίων με 1,2,3 και 4 διαδοχικά σταγόνες των 2 μL CB/CS, ενός ηλεκτροδίου με 2 σταγόνες των 3 μL CB/CS και ενός ηλεκτροδίου με 3 σταγόνες των 3 μL CB/CS. Έτσι, προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα:

- Τοποθετώντας 2 σταγόνες των 2 μL CB/CS, η αγωγιμότητα του ηλεκτροδίου αυξάνει πολύ συγκριτικά με τη 1 σταγόνα. (μαύρη γραμμή)
- Τοποθετώντας 3 σταγόνες των 2 μL CB/CS, η αγωγιμότητα του ηλεκτροδίου αυξάνει περισσότερο, ειδικά προς τα ψηλότερα δυναμικά. (γκρι γραμμή)

- Τοποθετώντας 4 σταγόνες των 2 μL CB/CS, η αγωγιμότητα του ηλεκτροδίου μειώνεται και φτάνει μεταξύ αυτής των 2 σταγόνων και αυτής των 3 σταγόνων. (κίτρινη γραμμή)
- Τοποθετώντας 2 σταγόνες των 3 μL CB/CS, επιτυγχάνεται αύξηση της αγωγιμότητας της επιφάνειας σε όλο το εύρος του διαγράμματος, συγκριτικά με τις περιπτώσεις εναπόθεσης 1,2,3 και 4 σταγόνων των 2 μL CB/CS. (κόκκινη γραμμή)
- Τοποθετώντας 3 σταγόνες των 3 μL CB/CS, επιτυγχάνεται η ψηλότερη αγωγιμότητα σε όλο το εύρος του διαγράμματος. (πράσινη γραμμή)



Γράφημα 50: CVs για το χαρακτηρισμό ηλεκτροδίων με 1,2,3 και 4 σταγόνες των 2 μL Carbon Black σε χιτοζάνη και δύο ηλεκτροδίων με 2 και 3 σταγόνες των 3 μL Carbon Black σε χιτοζάνη. Ο χαρακτηρισμός έγινε σε 50 mM Phosphate Buffer με 0,1M KCl, scan rate 50 mV/s

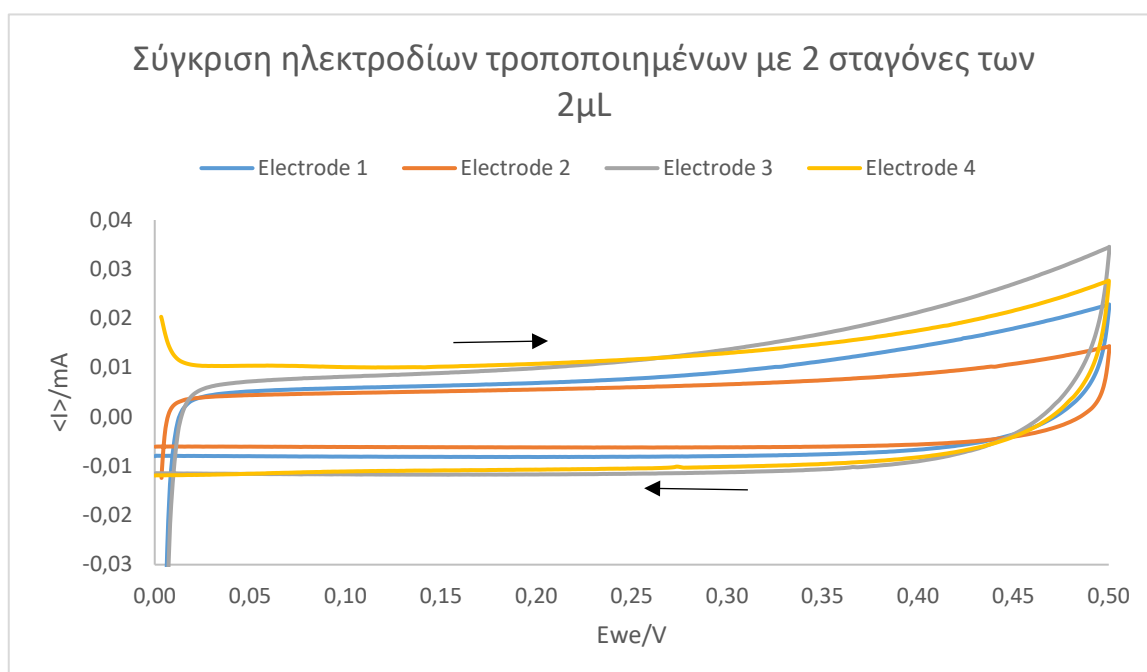
Στον παρακάτω πίνακα, παρουσιάζονται οι μέγιστες τιμές του ρεύματος για κάθε διάγραμμα όπως προκύπτει από το Γράφημα 52.

1 x 2 μL	2 x 2 μL	3 x 2 μL	4 x 2 μL	2 x 3 μL	3 x 3 μL
10 μA	27,7 μA	44,6 μA	31,9 μA	45,5 μA	68,9 μA

Πίνακας 8: Μέγιστο σήμα για κάθε ποσότητα Carbon Black που εναποτίθεται στα ηλεκτρόδια με βάση το Γράφημα 50

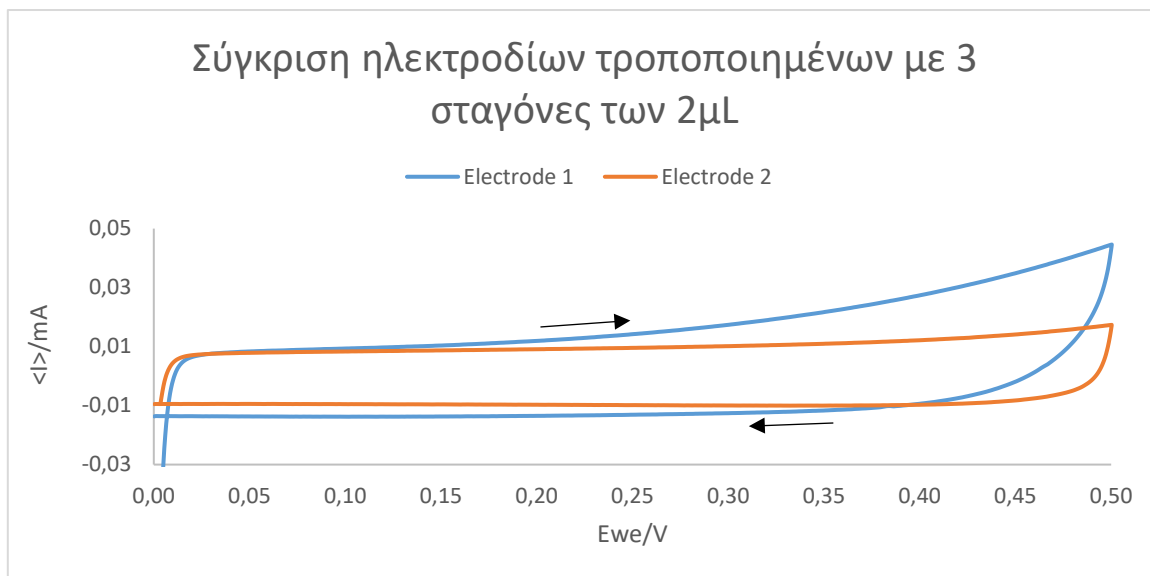
Πραγματοποιήθηκαν επαναλήψεις κάποιων πειραμάτων σχετικά με τον αριθμό και τον όγκο των σταγόνων που εναποτέθηκαν στις επιφάνειες των ηλεκτροδίων, με στόχο τον έλεγχο της αναπαραγωγισιμότητας αλλά και την εξακρίβωση των βέλτιστων συνθηκών τροποποίησης της επιφάνειας άνθρακα. Τα κυριότερα συμπεράσματα αυτής της μελέτης, αναφέρονται παρακάτω:

- Η περίπτωση της εναπόθεσης 2 σταγόνων των 2 μL CB/CS φαίνεται από το Γράφημα 51 πως δεν αποδίδει αναπαραγωγίσιμα αποτελέσματα ως προς την τροποποίηση της επιφάνειας, οπότε πρέπει να απορριφθεί.



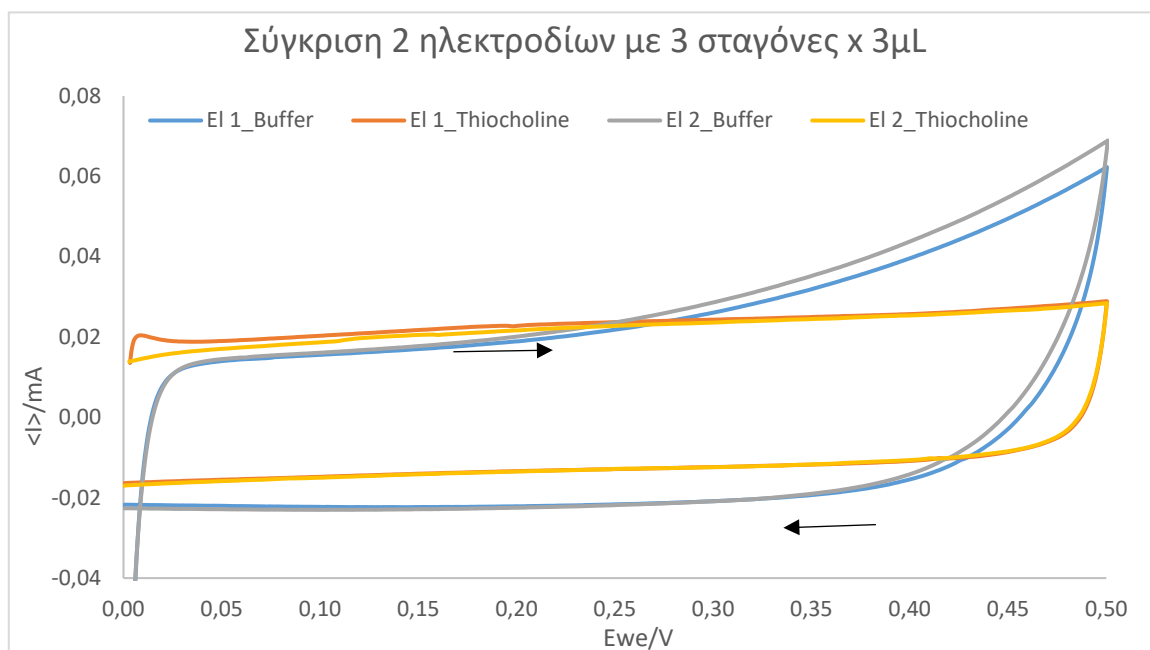
Γράφημα 51: CVs για το χαρακτηρισμό 4 ηλεκτροδίων τροποποιημένων με 2 σταγόνες 2 μL Carbon Black σε χιτοζάνη. Ο χαρακτηρισμός έγινε σε 50 mM Phosphate Buffer με 0,1M KCl, scan rate 50 mV/s

- Η περίπτωση της εναπόθεσης 3 σταγόνων των 2 μL CB/CS παρουσιάζει αρκετά καλή αγωγιμότητα, αλλά υστερεί εξίσου στην αναπαραγωγισιμότητα, οπότε πρέπει να απορριφθεί.



Γράφημα 52: CVs για το χαρακτηρισμό 2 ηλεκτροδίων τροποποιημένων με 3 σταγόνες 2μL Carbon Black σε χιτοζάνη. Ο χαρακτηρισμός έγινε σε 50 mM Phosphate Buffer με 0,1M KCl, scan rate 50 mV/s

- Η περίπτωση της εναπόθεσης 3 σταγόνων των 3 μL CB/CS παρουσιάζει την καλύτερη αγωγιμότητα γι' αυτό και επαναλήφθηκε σε δεύτερο ηλεκτρόδιο διατηρώντας το ψηλό σήμα.



Γράφημα 53: CVs για 2 ηλεκτρόδια τροποποιημένα με 3 σταγόνες 3μL Carbon Black σε χιτοζάνη. Για 50 mM Phosphate Buffer με 0,1M KCl και για 5mM θειοχολίνη, scan rate 50 mV/s

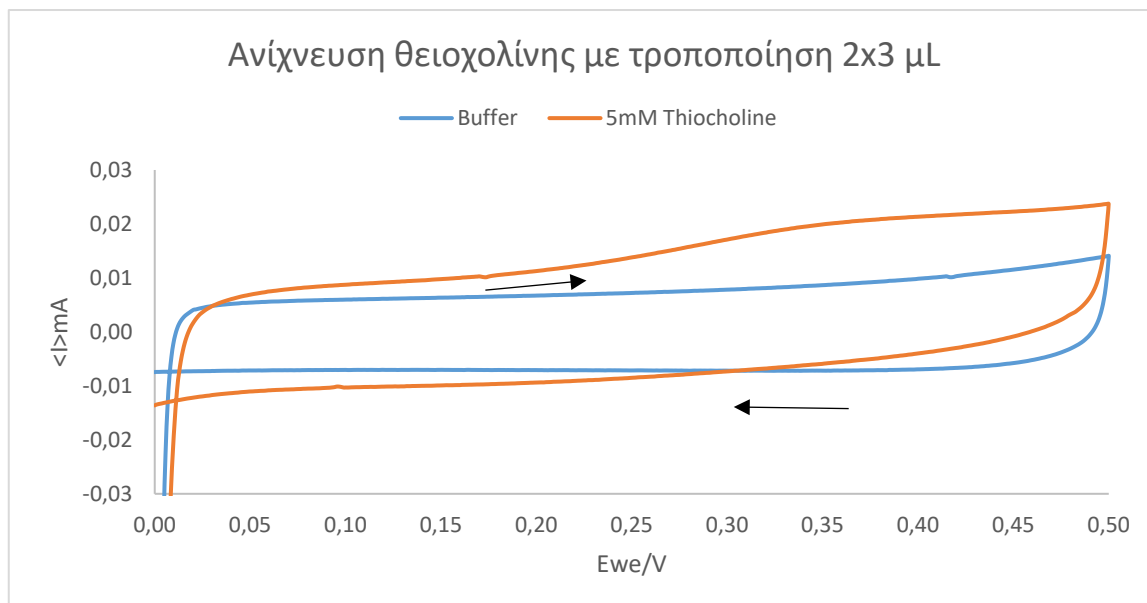
Σε αυτό το σημείο, υπολογίστηκε η ενεργός επιφάνεια των ηλεκτροδίων που κατασκευάστηκαν με τη βοήθεια της εξίσωσης 9 Randles-Sevcik. Για το συντελεστή διάχυσης χρησιμοποιήθηκε η τιμή $0,46 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$, για το σύστημα των $5\text{mM K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ - $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ σε 1x PBS . Με βάση τον Πίνακα 8 και την εξίσωση 9 για τον υπολογισμό της ενεργούς επιφάνειας ανάλογα με το ρεύμα οξείδωσης (I_{pa} στο CV) για το σκέτο ηλεκτρόδιο άνθρακα και τα τροποποιημένα με $1\text{x}2 \mu\text{L}$, $2\text{x}2 \mu\text{L}$ και $2\text{x}3 \mu\text{L}$, προκύπτουν τα εξής αποτελέσματα:

Ηλεκτρόδιο	Γεωμετρική επιφάνεια Gs (cm ²)	Ρεύμα Οξείδωσης I _{pa} (μΑ)	Ενεργός επιφάνεια As (cm ²)	% As/Gs
DRP-110	0,1256	92	0,143	13,8
DRP-110 + 1x2μL CB	0,1256	145	0,225	79,14
DRP-110 + 2x2μL CB	0,1256	160	0,248	97,45
DRP-110 + 2x3μL CB	0,1256	262	0,406	223,23

Πίνακας 9: Χαρακτηρισμός των τεσσάρων ηλεκτροδίων ως προς τις ηλεκτρικές ιδιότητες

Με βάση τον Πίνακα 9 προκύπτει πως η εναπόθεση 2 σταγόνων με $3 \mu\text{L}$ αυξάνει πολύ την ενεργή επιφάνεια του ηλεκτροδίου και άρα την ηλεκτρική αγωγιμότητά της, επομένως καθίσταται πιο ευαίσθητη για την ανίχνευση της μεταφοράς ηλεκτρονίων προς την επιφάνεια. Ταυτόχρονα, όπως φαίνεται στο Γράφημα 53, η τροποποίηση της επιφάνειας είναι αναπαραγωγίσιμη επομένως δοκιμάστηκε να χαρακτηριστεί με διάλυμα ενζυμικά παραγόμενης θειοχολίνης 5mM . Όμως, όπως φαίνεται στο Γράφημα 55, η οξείδωση της θειοχολίνης δεν ανιχνεύεται από την επιφάνεια, παρόλο που η αγωγιμότητα της τελευταίας έχει βελτιωθεί σημαντικά. Αυτή η έλλειψη ευαισθησίας πιθανώς οφείλεται στην παρεμπόδιση της μεταφοράς των ηλεκτρονίων προς την επιφάνεια εξαιτίας των αρκετών στρώσεων χιτοζάνης.

Επομένως, είναι προτιμότερο να χρησιμοποιηθεί η περίπτωση των 2 σταγόνων των $3 \mu\text{L}$ CB/CS, όπου ανιχνεύεται η οξείδωση της θειοχολίνης (Γράφημα 54), υστερώντας ελάχιστα στην αγωγιμότητα που επιτυγχάνεται με τις 3 σταγόνων των $3 \mu\text{L}$ CB/CS.



Γράφημα 54: CVs για 1 ηλεκτρόδιο τροποποιημένο με 2 σταγόνες 3μL Carbon Black σε χιτοζάνη. Για 50 mM Phosphate Buffer με 0,1M KCl και για 5mM θειοχολίνη, scan rate 50 mV/s

Τελικά, όλα τα πειράματα που ακολούθησαν πραγματοποιήθηκαν με την εφαρμογή του πρωτοκόλλου (b), δηλαδή με νανοσωματίδια Carbon Black σε Χιτοζάνη, με τη διαφοροποίηση ότι χρησιμοποιήθηκαν 2 σταγόνες των 3 μL. Η συγκέντρωση αυτή παρέιχε τη βέλτιστη αγωγιμότητα καθώς επιτεύχθηκε η αύξηση της ενεργούς επιφάνειας σε σχέση με το ατροποποίητο ηλεκτρόδιο άνθρακα.

6.2 Σταθερότητα τελικού στρώματος Carbon Black και φύλαξη των τροποποιημένων ηλεκτροδίων

Στην προηγούμενη υποενότητα διαπιστώθηκε ο απαιτούμενος αριθμός και όγκος των σταγόνων μίγματος Χιτοζάνης με Carbon Black, ώστε να αυξηθεί η αγωγιμότητα αλλά και η ευαισθησία του ηλεκτροχημικού αισθητήρα. Σε επόμενο στάδιο, εξετάστηκε η σταθερότητα της τροποποιημένης επιφάνειας στο πέρασμα του χρόνου, ταυτόχρονα με τις συνθήκες φύλαξης των τροποποιημένων ηλεκτροδίων.

6.2.1 Χρήση της αμπερομετρίας ως τεχνική χαρακτηρισμού

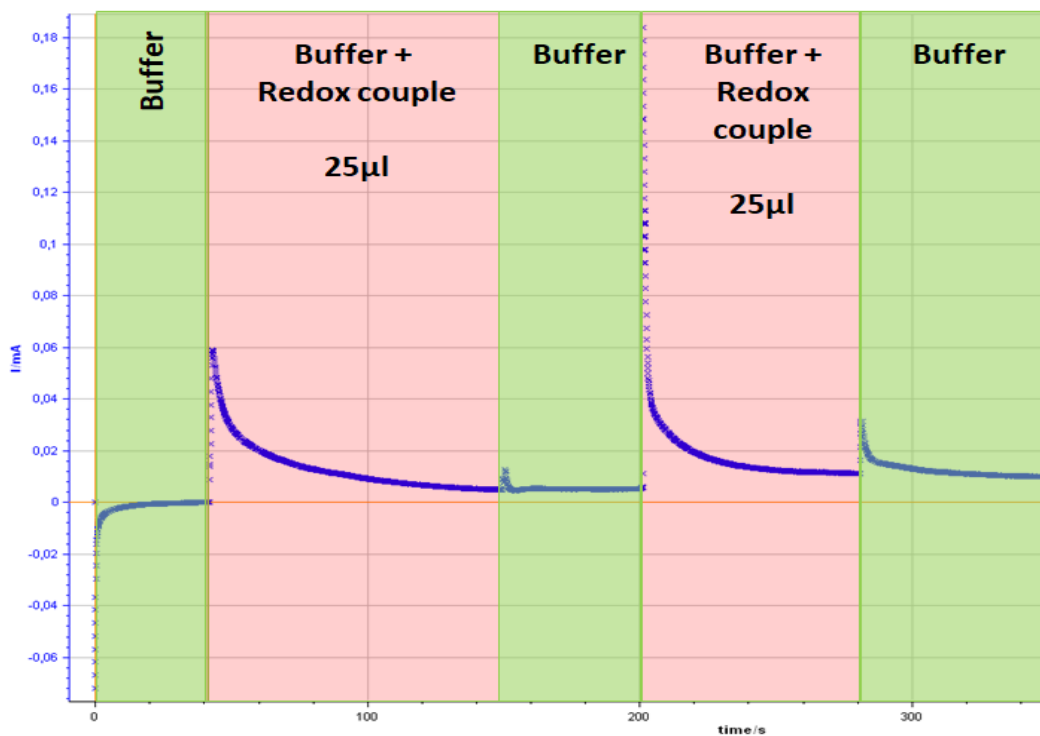
Βιβλιογραφικά, ανεξάρτητα από το υλικό τροποποίησης των επιφανειών, η αμπερομετρία είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται ευρέως για την ανίχνευση της οξειδωσης θειοχολίνης αλλά και την εξέταση της δραστικότητας της ακετυλοχολινεστεράσης πριν και μετά την αναστολή της από φυτοφάρμακα. Επομένως, εκτός από την κυκλική βολταμμετρία, η οποία είναι κατάλληλη για το χαρακτηρισμό της αγωγιμότητας μιας επιφάνειας, απαιτείται και η αμπερομετρία για την ανίχνευση της οξειδωσης ουσιών, ως αποτελέσματα χημικών αντιδράσεων, όπως είναι η δράση ενός ενζύμου. (84)

Στην περίπτωση του παρόντος ενζυμικού βιοαισθητήρα, η ακετυλοθειοχολίνη οξειδώνεται ενζυμικά από την AChE. Αυτό σημαίνει πως τα μόρια ακετυλοθειοχολίνης καταναλώνονται, με αποτέλεσμα την εξάντληση του υποστρώματος στην επιφάνεια του αισθητήρα. Σε μια συνεχή μέτρηση, το υπόστρωμα πρέπει να μεταφερθεί από τον κύριο όγκο του διαλύματος στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα, προκειμένου να ληφθεί ένα αξιόπιστο σήμα εξόδου. Με τη χρονοαμπερομετρία επιτυγχάνεται η ελεγχόμενη διάχυση και αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δυνατή επίτευξη αξιόπιστης απόκρισης ακόμη και σε στατικές μετρήσεις. (85)

Πιο συγκεκριμένα η αμπερομετρία αποτελεί μια ιδιαίτερα ευαίσθητη τεχνική ως προς τις μεταβολές του ρεύματος κατά τη διάρκεια μιας χημικής αντίδρασης, όπως αναφέρθηκε, ειδικά αν επιλεγθεί σωστά το εφαρμοζόμενο δυναμικό, το οποίο προκύπτει από το κυκλικό βολταμμογράφημα. Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκαν οι συνθήκες για την επίτευξη των βέλτιστων μετρήσεων, όπως θα αναλυθεί σε αυτό το εδάφιο. Στην υποενότητα 3.5 και ιδιαίτερα στην Εικόνα 30, παρουσιάζεται το τυπικό διάγραμμα ρεύματος συναρτήσει του χρόνου, που προκύπτει από μια αμπερομετρική μέτρηση και βασίζεται στην (Εξίσωση 6) Εξίσωση Cottrell.

Αρχικά, μελετήθηκε η αμπερομετρική απόκριση του ηλεκτροχημικού αισθητήρα με την εισαγωγή 50 mM Phosphate Buffer pH 7,4 και έπειτα, 50 mM Phosphate Buffer pH 7,4 μαζί με 5mM $K_3Fe(CN)_6 - K_4Fe(CN)_6$ για την ανίχνευση οξειδωαναγωγικών φαινομένων. (Γράφημα 55) Το βολταμμογράφημα ενός ηλεκτροδίου άνθρακα (Γράφημα 9)

είναι συμμετρικό ως προς την αρχή των αξόνων, επομένως το δυναμικό που χρησιμοποιήθηκε για την αμπερομετρία είναι 0V.



Γράφημα 55: Διάγραμμα αμπερομετρίας για την απόκριση του αισθητήρα στην εισαγωγή Phosphate Buffer και στην εισαγωγή Phosphate Buffer με 5mM $K_3Fe(CN)_6 - K_4Fe(CN)_6$

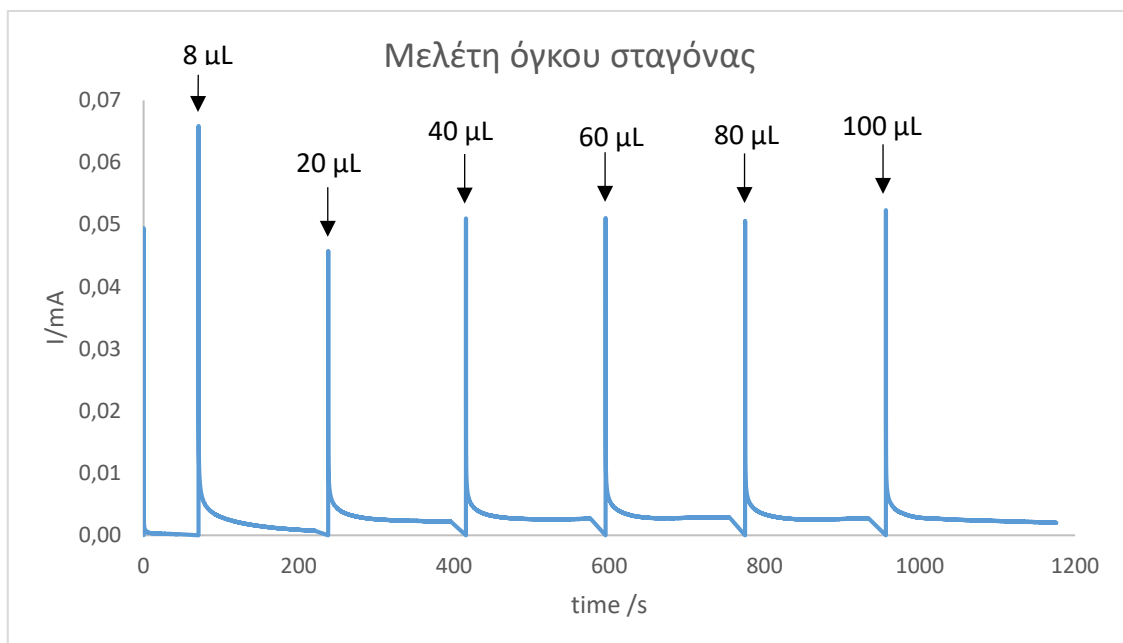
Στο γράφημα 57 απεικονίζεται η απόκριση της επιφάνειας άνθρακα σε κάθε προσθήκη σταγόνας Phosphate Buffer ή Buffer με το οξειδωαναγωγικό ζεύγος, με στατικό τρόπο. Η μέτρηση ξεκίνησε με την προσθήκη Phosphate Buffer και η απόκριση ήταν σταθερά μηδενική για αρκετά δευτερόλεπτα όπως φαίνεται στο πρώτο πράσινο χωρίο του γραφήματος. Η ένταση του ρεύματος με αυτή την τεχνική διαφέρει κατά πολύ από την αντίστοιχη ενός CV.

Έπειτα, με την εισαγωγή σταγόνας 25 μ L από το διάλυμα του Phosphate Buffer με $K_3Fe(CN)_6 - K_4Fe(CN)_6$, παρατηρείται μια απότομη αύξηση του σήματος, η οποία αποδίδεται ως θόρυβος και οφείλεται στον τρόπο με τον οποίο τοποθετείται η σταγόνα, καθώς η μέτρηση είναι συνεχής. Αυτή η πτώση του σήματος (πρώτο ροζ χωρίο), εξηγείται από την Εξίσωση Cottrell και οφείλεται στη διάχυση του οξειδωαναγωγικού ζεύγους πάνω στην επιφάνεια. Παρατηρείται πως πλέον το σήμα δε μηδενίζεται όπως στην περίπτωση του πρώτου Buffer εξαιτίας της παρουσίας φορτίων.

Στη συνέχεια, προστίθεται νέα σταγόνα 25 μL από το Phosphate Buffer και παρατηρείται πως η απόκριση της επιφάνειας παρουσιάζει πλατό (δεύτερο πράσινο χωρίο). Γενικά, στις αμπερομετρικές μετρήσεις όπου τοποθετείται μια ηλεκτρικά ουδέτερη ουσία όπως το Phosphate Buffer με pH 7,4, το ρεύμα αφήνεται να σταθεροποιηθεί σε μία τιμή ως ένδειξη ότι το σύστημα έχει φτάσει σε μια ισορροπία. Η χρονική διάρκεια της σταθεροποίησης ποικίλλει ανάλογα με την επιφάνεια του αισθητήρα, το είδος του διαλύματος που προστείνεται κλπ. Για τον προσδιορισμό της ανίχνευσης της οξειδωσίας μιας ουσίας, απαιτείται επίσης κάποιος χρόνος σταθεροποίησης του ρεύματος σε μια τιμή. Η διάρκεια αυτή μπορεί να είναι από μερικά δευτερόλεπτα έως και ώρες και διαφοροποιείται ανάλογα για το κάθε ηλεκτροανλυτικό σύστημα.

Εφόσον έχει σταθεροποιηθεί το σήμα, εισάγεται νέα σταγόνα του διαλύματος οξειδωσαναγωγικού ζεύγους και παρατηρείται πως η πτώση του σήματος είναι πιο απότομη σε σχέση με την προηγούμενη εισαγωγή του ίδιου διαλύματος. Επίσης, φαίνεται (δεύτερο ροζ χωρίο), ότι το σήμα φτάνει σε μια σταθερή τιμή σχετικά γρηγορότερα και σε αρκετά μεγαλύτερο ρεύμα. Αυτό πιθανώς οφείλεται στο ότι, επειδή το οξειδωσαναγωγικό ζεύγος δεν απομακρύνεται από την επιφάνεια μεταξύ των μετρήσεων, κάθε νέα προσθήκη αυτού παράγει μεγαλύτερο σήμα καθώς «χτίζει» πάνω στην ήδη υπάρχουσα στρώση.

Τέλος, προς επιβεβαίωση των παραπάνω, με την τελευταία εισαγωγή Phosphate Buffer, το σήμα σταθεροποιείται σε ακόμη μεγαλύτερη τιμή σε σχέση με τις προηγούμενες φορές. Έπειτα, μελετήθηκε ο βέλτιστος όγκος της σταγόνας που απαιτείται να τοποθετηθεί στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου άνθρακα με πιπετα, ώστε να ληφθεί το μέγιστο σήμα. Δοκιμάστηκαν οι όγκοι των 8,20,40,60,80 και 100 μL για 10 mM θειοχολίνης, η οποία παράχθηκε ενζυμικά και υπολογίστηκε η συγκέντρωσή της μέσω του νόμου Beer-Lambert (Εξίσωση 7).



Γράφημα 56: Αμπερομετρική απόκριση επιφάνειας άνθρακα στην εισαγωγή διαφορετικού όγκου σταγόνων 10 mM θειοχολίνης

Για την εκτέλεση του πειράματος, η μέτρηση ξεκίνησε με Phosphate Buffer, στα 70 sec προστέθηκαν 8 μL θειοχολίνης, στα 200 sec παρουσιάστηκε πλατό οπότε εισήχθησαν τα 20 μL . Στα επόμενα 200 sec παρουσιάστηκε πλατό οπότε στα 400 εισήχθησαν 40 μL κ.ο.κ.. Από το Γράφημα 56, προκύπτει πως ο βέλτιστος όγκος σταγόνας για τη λήψη μεγαλύτερου σήματος είναι τα 60 μL , καθώς στα 80 και 100 μL δεν παρατηρείται περαιτέρω άνοδος της απόκρισης. Οι τιμές του ρεύματος σε μA για κάθε όγκο σταγόνας φαίνονται στον παρακάτω πίνακα. Ταυτόχρονα, το υγρό διαχέεται και εκτός της ωφέλιμης επιφάνειας προς όλες τις κατευθύνσεις οπότε ο τελικός όγκος πάνω στην περιοχή εργασίας μειώνεται.

Όγκος σταγόνας (μL)	Ρεύμα (μA)
8	0,7
20	2,2
40	2,6
60	2,8
80	2,7
100	2,3

Πίνακας 10: Τιμές ρεύματος για κάθε όγκο σταγόνας σε αμπερομετρικές μετρήσεις

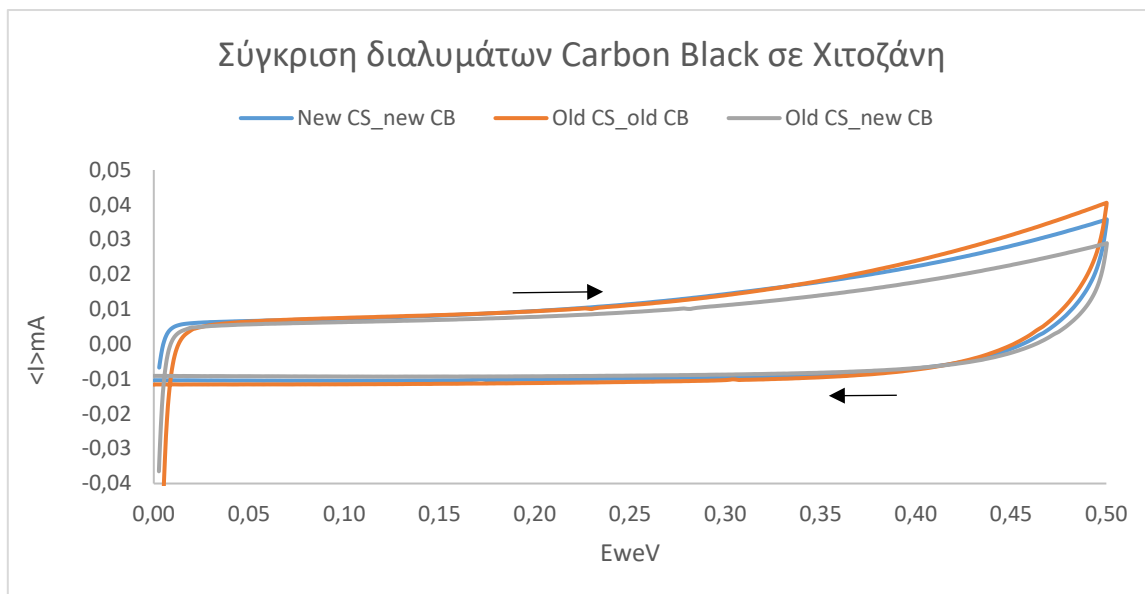
6.2.2 Μελέτη σταθερότητας και συνθήκες φύλαξης των τροποποιημένων ηλεκτροδίων

Με τη βοήθεια των συμπερασμάτων της προηγούμενης υποενότητας, στην οποία αναφέρθηκαν οι κατάλληλες συνθήκες για μια αμπερομετρική μέτρηση, σε αυτήν την ενότητα εξετάζεται η σταθερότητα του στρώματος Carbon Black μέσα σε Χιτοζάνη, με το οποίο τροποποιείται η επιφάνεια, καθώς και οι συνθήκες φύλαξης των ηλεκτροδίων.

Αρχικά, μελετήθηκε η σταθερότητα του διαλύματος χιτοζάνης ως προς το pH αλλά και ως προς τη λειτουργικότητά του, σε διάφορες συνθήκες, όπως αναφέρεται παρακάτω. Παρασκευάστηκαν τα εξής ηλεκτρόδια:

- 1) Ηλεκτρόδιο 1: Καινούριο μίγμα Χιτοζάνης με καινούρια ανάμιξη του Carbon Black.
- 2) Ηλεκτρόδιο 2: Παλιό μίγμα Χιτοζάνης (περίπου μίας εβδομάδας) με pH 4 και παλιά ανάμιξη του Carbon Black.
- 3) Ηλεκτρόδιο 3: Παλιό μίγμα Χιτοζάνης (από stock διάλυμα, με pH 4) με καινούρια ανάμιξη του Carbon Black.

Τα τρία ηλεκτρόδια, αφού τροποποιήθηκαν με 2 σταγόνες των 3 μL Carbon Black σε Χιτοζάνη από τα κατάλληλα διαλύματα, χαρακτηρίστηκαν με 50 mM Phosphate Buffer pH 7,4 με CV. Σύμφωνα με το Γράφημα 57, διαπιστώνεται πως τα διαφορετικά μίγματα χιτοζάνης με Carbon Black δεν διαφέρουν σημαντικά στα σήματα μεταξύ τους. Τόσο η χιτοζάνη, όσο και όλο το μίγμα φαίνεται να συντηρείται στο ψυγείο. Για πιο αξιόπιστα αποτελέσματα, προτείνεται για ένα πείραμα να χρησιμοποιείται το ίδιο διάλυμα χιτοζάνης με CB ώστε να μη διαπιστώνονται προβλήματα αναπαραγωγιμότητας.

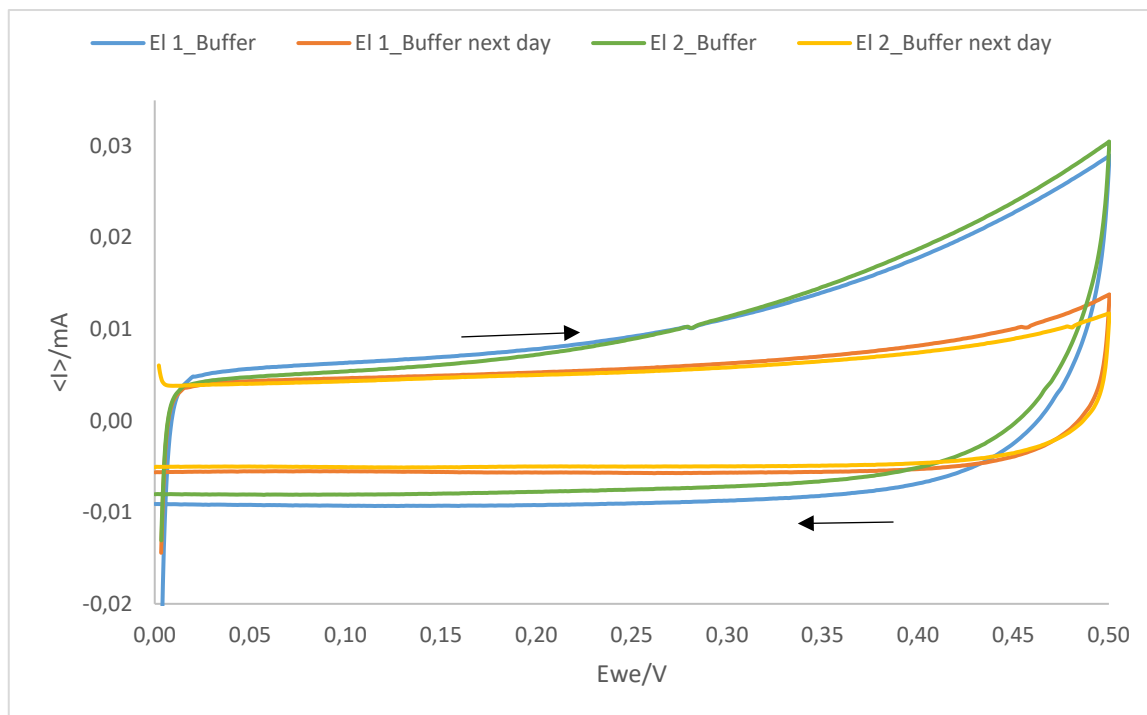


Γράφημα 57: Σύγκριση τριών συνθηκών του διαλύματος Carbon Black, χαρακτηρισμός σε 50 mM Phosphate Buffer pH 7,4, με scan rate 50 mV/s

Έπειτα, κατασκευάστηκαν 2 ηλεκτρόδια με 2 σταγόνες των 3 μL Carbon Black σε διάλυμα Χιτοζάνης. Αφού οι επιφάνειες στέγνωσαν, χαρακτηρίστηκαν ως προς CV με 50 mM Phosphate Buffer pH 7,4 και τα αποτελέσματά τους φαίνονται στο Γράφημα 58. Τα CV που προέκυψαν από την τροποποίηση ήταν παρόμοια (μπλε και πράσινη γραμμή). Τα δυο αυτά ηλεκτρόδια αμέσως μετά το χαρακτηρισμό φυλάχτηκαν στο ψυγείο για ένα βράδυ και την επόμενη μέρα χαρακτηρίστηκαν ξανά με το ίδιο Buffer. Τα CV που προέκυψαν από τον δεύτερο χαρακτηρισμό ήταν επίσης παρόμοια μεταξύ τους (κίτρινη και πορτοκαλί γραμμή), αλλά χαμηλότερου σήματος από τα αρχικά.

Από το Γράφημα 58, παρατηρείται μεταβολή του σήματος της τροποποιημένης επιφάνειας άνθρακα, η οποία οφείλεται σε δύο πιθανούς λόγους:

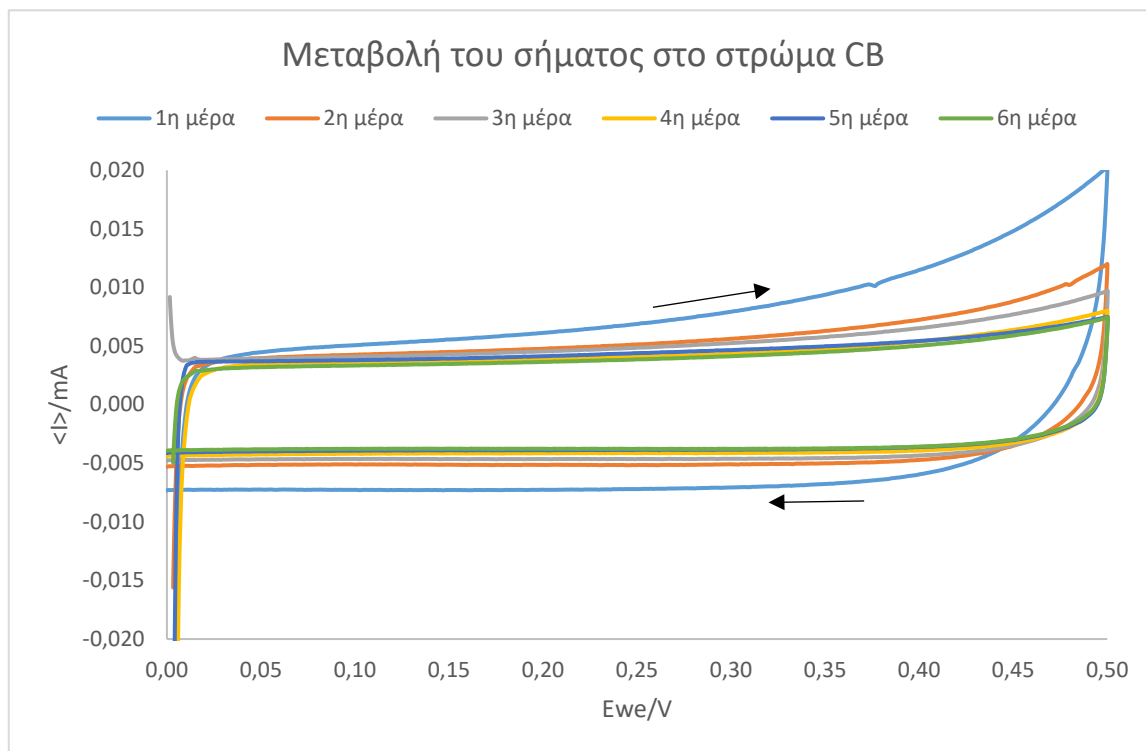
- i. Η μέτρηση με Buffer αλλάζει την επιφάνεια,
- ii. Η αποθήκευση του ήδη χαρακτηρισμένου με Buffer ηλεκτροδίου over night προκάλεσε την πτώση του σήματος.



Γράφημα 58: Χαρακτηρισμός της επιφάνειας 2 τροποποιημένων ηλεκτροδίων άνθρακα με Carbon Black με 50 mM Phosphate Buffer pH 7,4 τη μέρα της παρασκευής τους και την επόμενη.

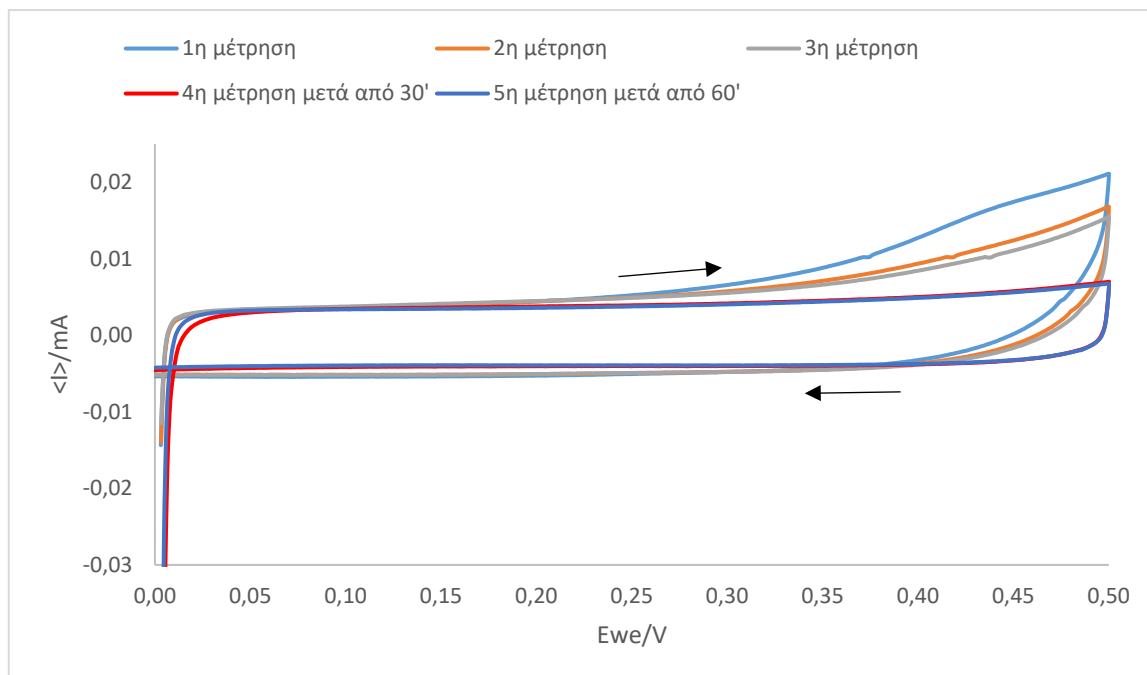
Επομένως, το επόμενο πείραμα σχεδιάστηκε ως εξής, δύο ηλεκτρόδια άνθρακα τροποποιήθηκαν με δύο σταγόνες των 3 μL Carbon Black σε διάλυμα Χιτοζάνης και το ένα χαρακτηρίστηκε κατευθείαν με Buffer και αποθηκεύτηκε στο ψυγείο. Χαρακτηρίστηκε ξανά την επόμενη μέρα αποδίδοντας χαμηλότερο σήμα όπως ήταν αναμενόμενο και αποθηκεύτηκε στο ψυγείο. Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε έως την έκτη μέρα από την παρασκευή του ηλεκτροδίου. Το δεύτερο ηλεκτρόδιο σχεδιάστηκε ώστε να χαρακτηριστεί για πρώτη φορά με το Phosphate Buffer, την ημέρα που θα σταθεροποιούνταν το σήμα του πρώτου, ώστε να εξεταστούν οι πιθανές αιτίες της πτώσης του σήματος.

Στο Γράφημα 59 παρουσιάζονται οι καθημερινοί χαρακτηρισμοί του πρώτου τροποποιημένου ηλεκτροδίου σε 50 mM Phosphate Buffer pH 7,4 και παρατηρείται πως η πτώση του σήματος εξακολουθεί να συμβαίνει και μετά τη δεύτερη μέρα. Για την ακρίβεια, η σταθεροποίηση προκύπτει μετά την τρίτη μέρα. Επομένως, με σιγουριά ο χαρακτηρισμός με Buffer μεταβάλλει κατά κάποιον τρόπο την επιφάνεια.



Γράφημα 59: CVs για τροποποιημένο ηλεκτρόδιο άνθρακα με CB σε χιτοζάνη ανά 1 μέρα, με 50 mM Phosphate Buffer pH 7,4, χαρακτηριζόμενο κάθε μέρα με scan rate 50 mV/s

Έτσι, από τη στιγμή που το πρώτο ηλεκτρόδιο σταθεροποιήθηκε την 5^η μέρα, χαρακτηρίστηκε και το δεύτερο με Phosphate Buffer με CV. Ο πρώτος χαρακτηρισμός απέδωσε χαμηλότερο σήμα από το αντίστοιχο της 1^{ης} μέρας του πρώτου ηλεκτροδίου (ανοιχτή μπλε γραμμή στο Γράφημα 59). Έπειτα, το ηλεκτρόδιο χαρακτηρίστηκε ξανά κατευθείαν σε Phosphate Buffer και το σήμα του ήταν ακόμη χαμηλότερο από το πρώτο. Μέσα στη μέρα ακολούθησαν άλλες δυο μετρήσεις με μικρή χρονική απόσταση μεταξύ τους (Γράφημα 60).

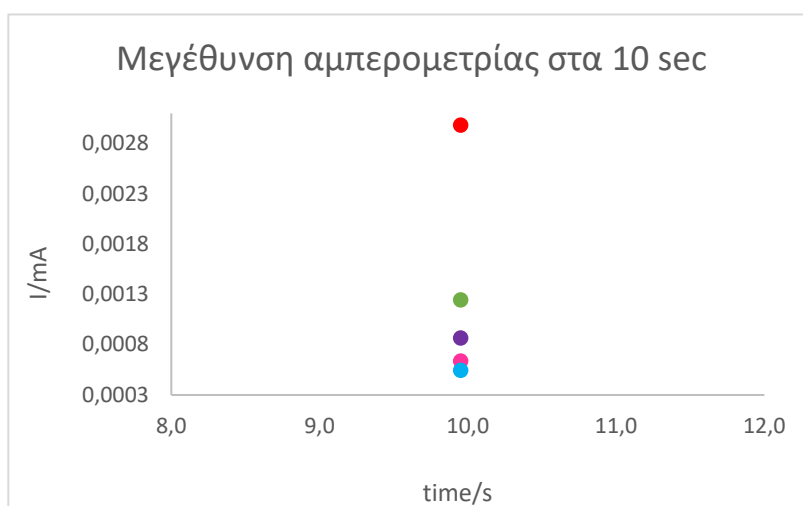
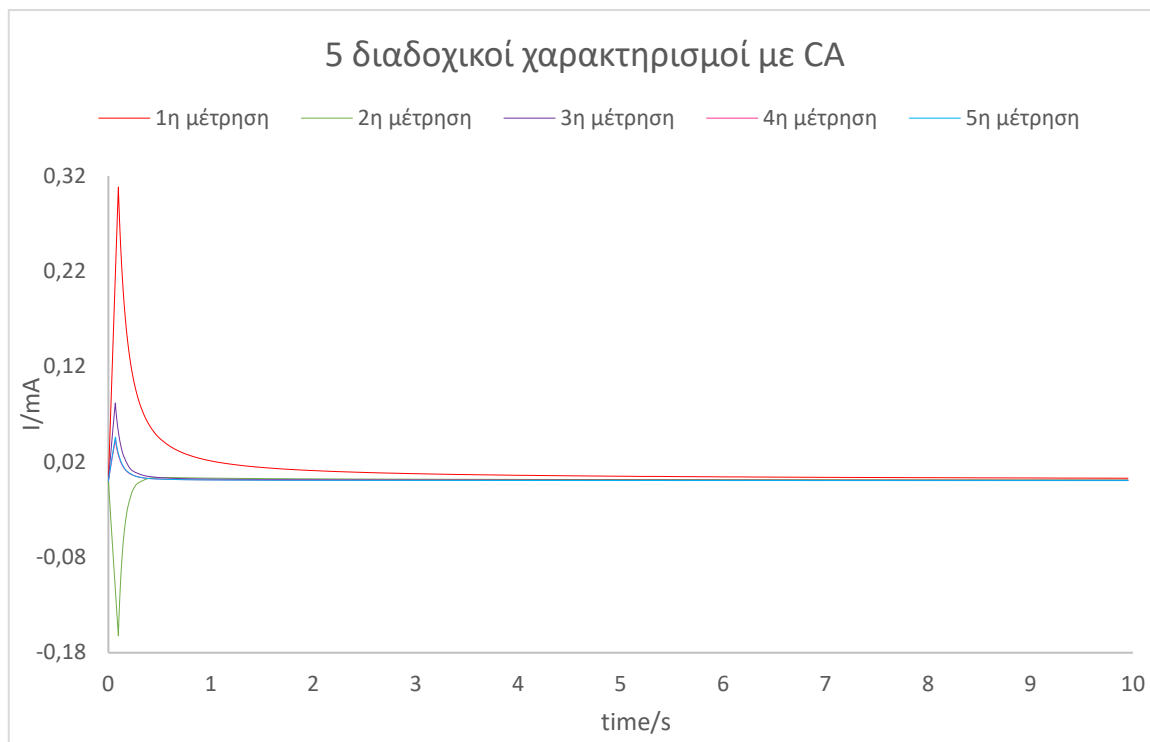


Γράφημα 60: CVs για τροποποιημένο ηλεκτρόδιο άνθρακα με CB σε χιτοζάνη ανά 1 μέρα, με 50 mM Phosphate Buffer pH 7,4, με scan rate 50 mV/s

Διαπιστώνεται από το Γράφημα 59 και το Γράφημα 60, ότι παίζει ένα μικρό ρόλο στην πτώση του σήματος η αποθήκευση του τροποποιημένου ηλεκτροδίου με Carbon Black σε χιτοζάνη, αλλά όχι τόσο σημαντικό όσο ο συνεχόμενος χαρακτηρισμός με Buffer. Παράλληλα, προκύπτει ότι τα σήματα που λήφθηκαν από τις καθημερινές μετρήσεις είναι παραπλήσιες και στην περίπτωση των διαδοχικών μετρήσεων μέσα στη μέρα. Επομένως, η σταθεροποίηση του στρώματος με Buffer μπορεί να επιτευχθεί με επαναλαμβανόμενους κύκλους CV.

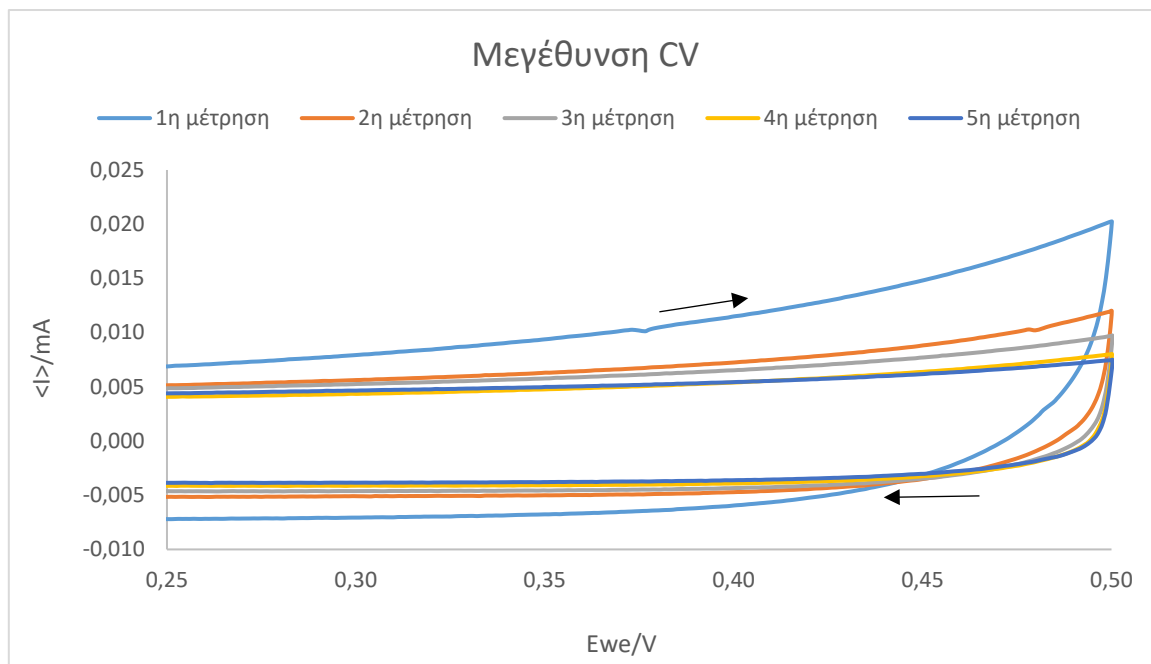
Σε επόμενο στάδιο παρασκευάστηκαν ακόμη 2 ηλεκτρόδια με 2 σταγόνες των 3 μL Carbon Black σε Χιτοζάνη, με στόχο το χαρακτηρισμό του ενός με CV και του άλλου με CA (αμπερομετρία) έτσι ώστε να διαπιστωθεί και πειραματικά ποια είναι η πιο ευαίσθητη τεχνική. Έτσι, μετά την εναπόθεση και το στέγνωμα των 2 σταγόνων, τα ηλεκτρόδια χαρακτηρίστηκαν 5 συνεχόμενες φορές σε 50 mM Phosphate Buffer pH 7,4.

Από το Γράφημα 40 και το Γράφημα 54, όπου απεικονίζεται η ανίχνευση της οξειδωσης της θειοχολίνης, προκύπτει πως κατά μέσο όρο στα 0,35 V αναμένεται η παρουσία της κορυφής. Επομένως, αυτή θα είναι και η τιμή του εφαρμοζόμενου δυναμικού στην αμπερομετρία.



Γράφημα 61: Πάνω: 5 διαδοχικοί χαρακτηρισμοί του τροποποιημένου ηλεκτροδίου με αμπερομετρία στα 0,35 V με 50 mM Phosphate Buffer pH 7,4, Κάτω: μεγέθυνση του πάνω γραφήματος στα 10 sec

Στο Γράφημα 62, παρουσιάζονται τα διαδοχικά μεγεθυμένα CVs του ηλεκτροδίου που χαρακτηρίστηκε μόνο με αυτόν τον τρόπο. Η μεγέθυνση έχει γίνει με τέτοιο τρόπο ώστε να είναι ευδιάκριτα τα διαγράμματα στην περιοχή κοντά στα 0,35 V.



Γράφημα 62: Μεγέθυνση 5 διαδοχικών CVs για ένα τροποποιημένο ηλεκτρόδιο άνθρακα με CB σε χιτοζάνη, χαρακτηρισμός σε 50 mM Phosphate Buffer pH 7,4, με scan rate 50 mV/s

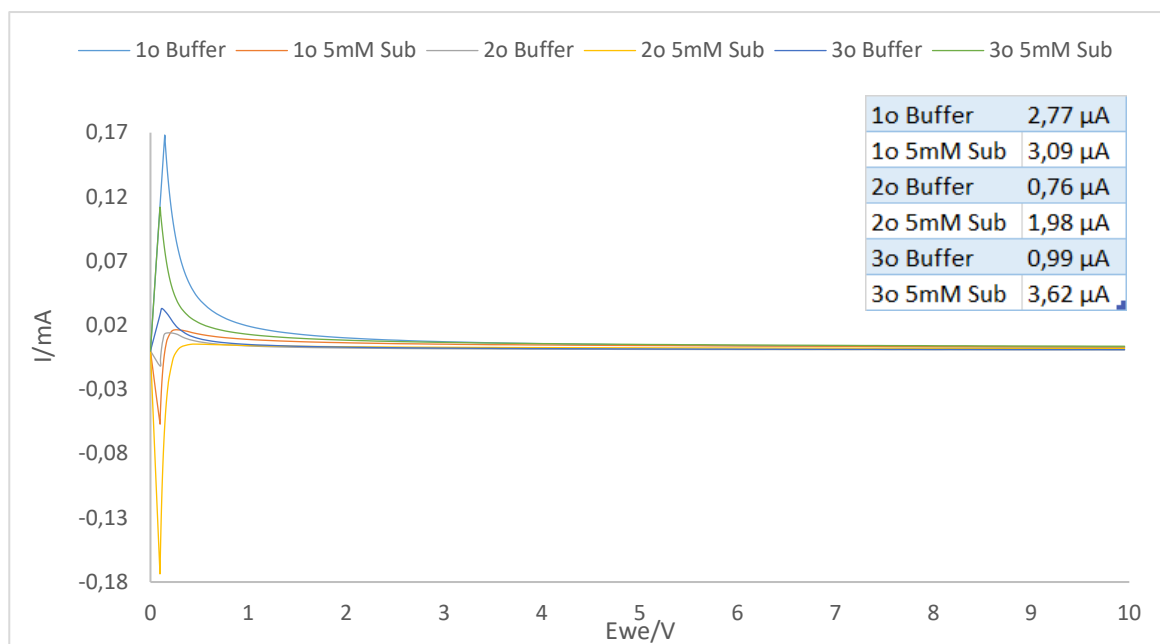
Η σύγκριση των δύο τεχνικών αφορά τα 0,35 V. Στη μεγέθυνση του Γράφημα 61, παρατηρείται η διαφοροποίηση και των 5 σημείων των γραφημάτων που λήφθηκαν στα 10 sec. Η επιλογή των 10 δευτερολέπτων σχετίζεται με το χρόνο που χρειάζεται το σύστημα να έρθει σε ισορροπία (δημιουργία πλατό). Αντίθετα, παρά τη μεγέθυνση των CV διαγραμμάτων κοντά στα 0,35 V στο Γράφημα 62, τα σημεία της 2^{ης} και 3^{ης} μέτρησης, όπως και της 4^{ης} και 5^{ης} είναι λιγότερο ευδιάκριτα. Λόγος που καθιστά την αμπερομετρική τεχνική πιο ευαίσθητη σε μικρές μεταβολές του ρεύματος.

Από τα παραπάνω, προκύπτει πως η εφαρμογή δυναμικού σε συνδυασμό με το Phosphate Buffer επιφέρει αλλαγές στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Το ερώτημα που τίθεται σε αυτό το σημείο είναι πώς αυτή η προ-επεξεργασία του ηλεκτροδίου επηρεάζει την αμπερομετρική ανίχνευση της θειοχολίνης η οποία παράγεται πάνω στην επιφάνεια με τη βοήθεια του ακινητοποιημένου ενζύμου.

Για την επίλυση αυτού του ζητήματος, τροποποιήθηκαν ακόμη δύο επιφάνειες άνθρακα με 2 σταγόνες των 3 των 3 μL Carbon Black σε Χιτοζάνη, με στόχο τον αμπερομετρικό χαρακτηρισμό του ενός με Phosphate Buffer για 10 sec μετά την εναπόθεση του ενζύμου στην επιφάνεια και τον αμπερομετρικό χαρακτηρισμό του άλλου

με Phosphate Buffer για περισσότερη ώρα μέχρι να σταθεροποιηθεί το σήμα μετά την εναπόθεση του ενζύμου. Για να επιτευχθεί η εναπόθεση του ενζύμου, μετά τις σταγόνες του Carbon Black σε χιτοζάνη εναποτέθηκαν και στα δύο ηλεκτρόδια 2 μL γλουταραλδεΐδη 0,25% και έπειτα 2 μL από το μίγμα των 0,1% Nafion, 3% BSA και 33 U/mL της AChE.

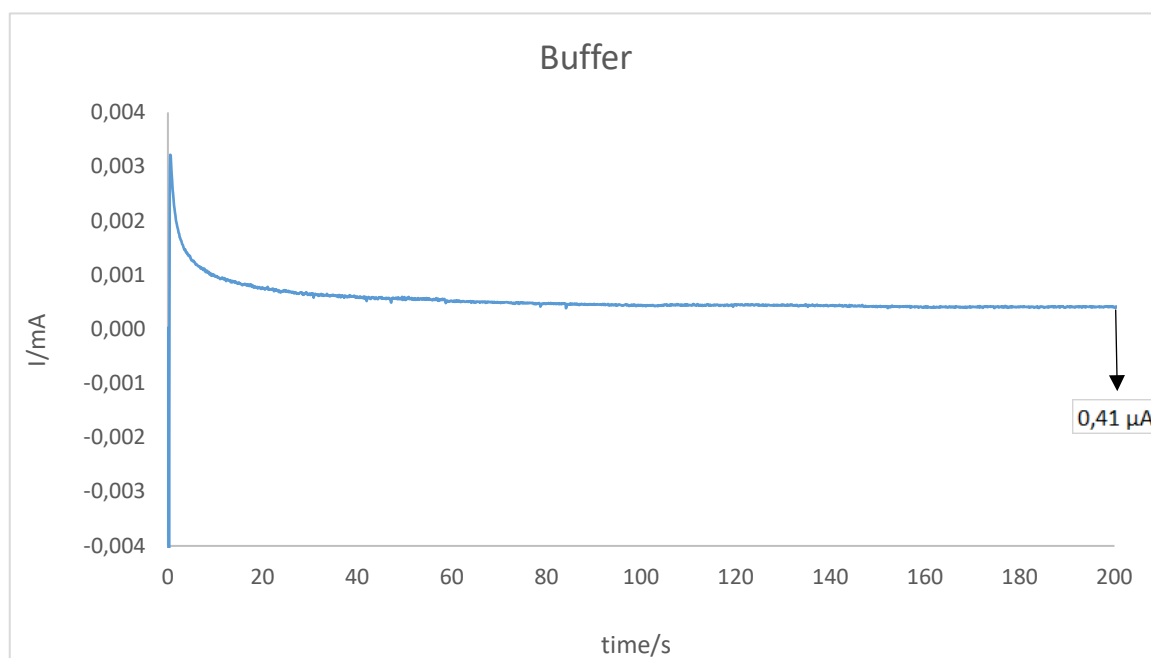
Το πρώτο ηλεκτρόδιο μετά την τροποποίησή του χαρακτηρίστηκε αμπερομετρικά στα 0,35 V με Phosphate Buffer για 10 sec και έπειτα με παύση της μέτρησης απομακρύνθηκε το διάλυμα από την επιφάνεια και προστέθηκαν 5 mM υποστρώματος ακετυλοθειοχολίνης με συνέχιση της μέτρησης μέχρι τα επόμενα 10 sec. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε δύο ακόμη φορές για το Buffer και τα 5 mM υποστρώματος. Τα αποτελέσματα της μέτρησης απεικονίζονται στο Γράφημα 63.



Γράφημα 63: CA για το πρώτο ηλεκτρόδιο με CB/CS και μίγμα ενζύμου (33 U/mL). Επαναλαμβανόμενη προσθήκη 50 mM Phosphate Buffer pH 7,4 και 5 mM υποστρώματος, στα 0,35V

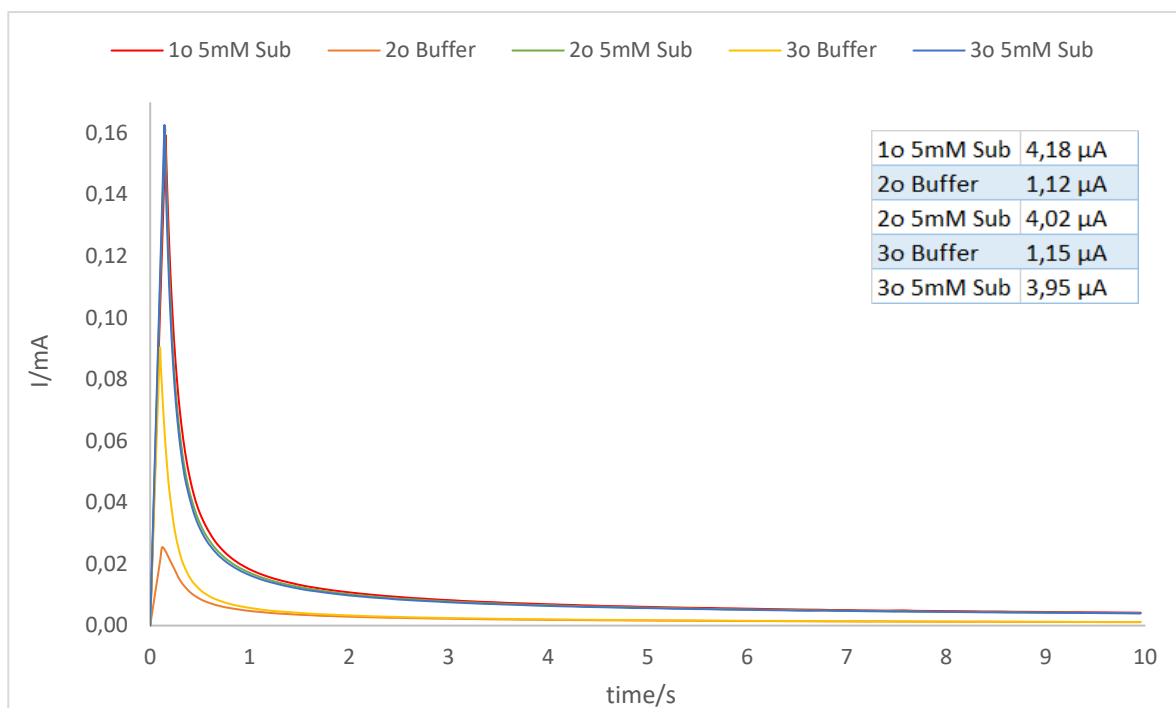
Στο υπόμνημα του Γραφήματος 63 αναγράφονται οι τιμές του ρεύματος του τελευταίου σημείου κάθε διαγράμματος στα 10 δευτερόλεπτα. Οι τιμές αυτές φανερώνουν πως υπάρχει αστάθεια στις μετρήσεις που αφορούν κυρίως το ρεύμα που προκύπτει στη μέτρηση της ενζυμικά παραγόμενης θειοχολίνης, ενώ θα έπρεπε να είναι παρόμοιες.

Παράλληλα, το δεύτερο τροποποιημένο ηλεκτρόδιο εκτέθηκε στην αμπερομετρική μέτρηση σε Phosphate Buffer για 200 sec, μέχρι η τιμή του να σταθεροποιηθεί (πιάνει πλατό) χαμηλά στα 0,41 μA , όπως επιτεύχθη και στο Γράφημα 61 με διαδοχικές μετρήσεις (τελευταία τιμή στα 0,56 μA).



Γράφημα 64: CA γράφημα του δεύτερου ηλεκτροδίου με CB/CS και μίγμα ενζύμου (33 U/mL). Χαρακτηρισμός με 50 mM Phosphate Buffer pH 7,4 για 200 sec μέχρι την σταθεροποίηση, στα 0,35V

Ύστερα από αυτή την προ-επεξεργασία σταθεροποίησης του Buffer, ακολούθησε η διαδοχική προσθήκη 5 mM υποστρώματος ακετυλοθειοχολίνης με έναρξη της μέτρησης μέχρι τα πρώτα 10 sec. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε δύο ακόμη φορές για το Buffer και τα 5 mM υποστρώματος. Τα αποτελέσματα της μέτρησης απεικονίζονται στο Γράφημα 65 με το αντιστοιχο υπόμνημα να δείχνει τις τιμές του ρεύματος του τελευταίου σημείου κάθε διαγράμματος στα 10 δευτερόλεπτα.



Γράφημα 65: CA γραφήματα του δεύτερου ηλεκτροδίου με CB/CS και μίγμα ενζύμου (33 U/mL). Επαναλαμβανόμενη προσθήκη 5 mM υποστρώματος και 50 mM Phosphate Buffer pH 7,4, στα 0,35V

Από το Γράφημα 60, διαπιστώνεται ότι η προεπεξεργασία της επιφάνειας με Buffer και εφαρμοζόμενο δυναμικό επιφέρει μια σταθερότητα στις μετρήσεις που ακολουθούν τόσο ως προς τη μέτρηση της ενζυμικά παραγόμενης θειοχολίνης, όσο και ως προς το Buffer. Η 2^η και 3^η μέτρηση του Buffer στα 10 sec είναι ψηλότερες σε σχέση με αυτή του Γραφήματος 64, διότι μετά την πρώτη μέτρηση της θειοχολίνης ενδεχομένως να υπάρχουν εναπομείναντα φορτία κοντά στην επιφάνεια παρά την απομάκρυνση του διαλύματος.

Όταν ένα ηλεκτρόδιο τροποποιημένο με κάποιο αγώγιμο πολυμερές, τεθεί υπό ένα ορισμένο σταθερό δυναμικό, μεγάλα ρεύματα θα ρέουν στην αρχή λόγω της χωρητικής φόρτισης του πολυμερούς. Αυτά τα φορτία γίνονται εντοπισμένα μέσα στη μήτρα του πολυμερούς. (85)

Καταλήγοντας, για να σταθεροποιηθεί το στρώμα του Carbon Black σε χιτοζάνη πάνω στην επιφάνεια και να ληφθούν έγκυρες μετρήσεις, απαιτείται η προ-επεξεργασία της επιφάνειας με Buffer και εφαρμοζόμενο δυναμικό στα 0,35 V για 200sec.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΕΝΑΠΟΘΕΣΗΣ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ

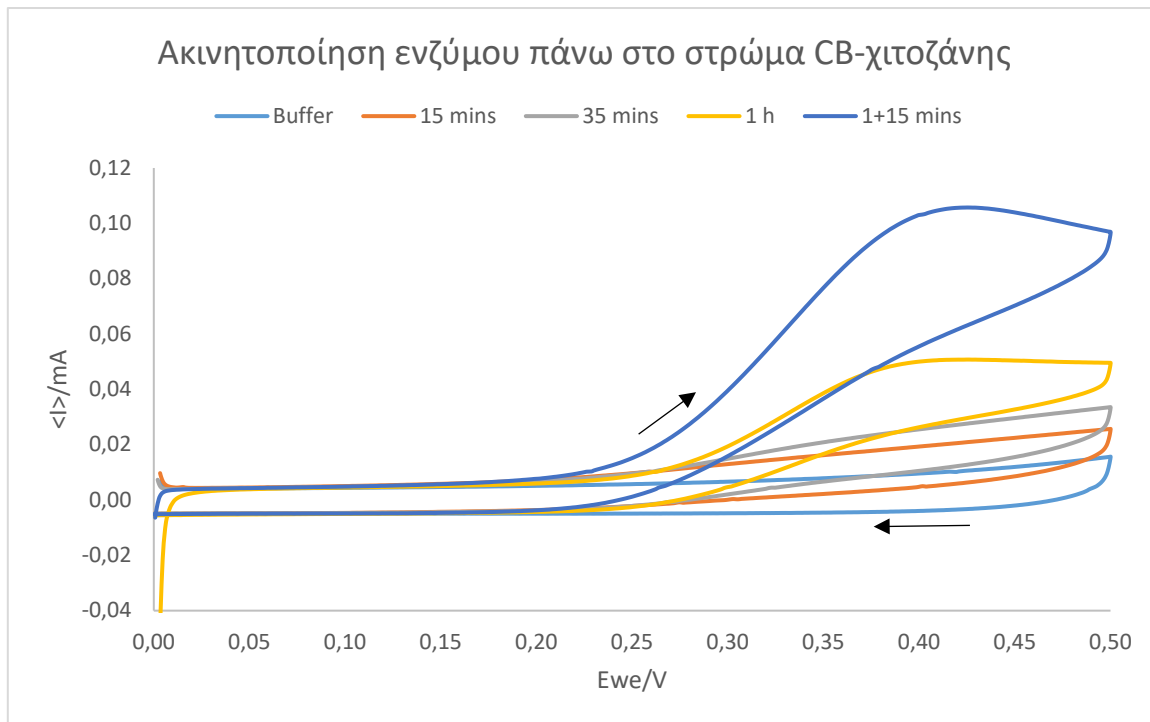
7.1 Ακίνητοποίηση της AChE σε τροποποιημένα ηλεκτρόδια άνθρακα με Carbon Black σε χιτοζάνη

Στο ποηγούμενο κεφάλαιο εξετάστηκαν εκτενώς οι βέλτιστες συνθήκες τροποποίησης των ηλεκτροδίων άνθρακα με Carbon Black εντός του πολυμερικού δικτύου της χιτοζάνης, με τελικό στόχο την ακίνητοποίηση του ενζύμου για την ανίχνευση της θειοχολίνης. Μέχρι αυτό το σημείο, όσες φορές χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο για την παραγωγή θειοχολίνης, ακίνητοποιήθηκε με βάση το πρωτόκολλο των Talarico et al. (74).

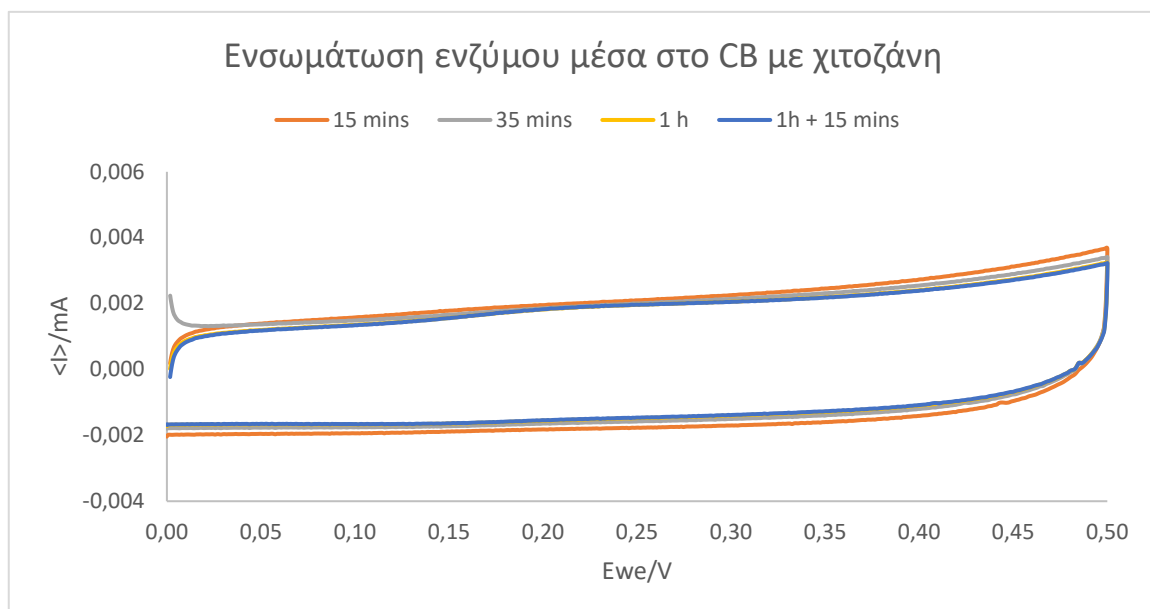
Συμπληρωματικά με αυτή την τεχνική, δοκιμάστηκε και η ακίνητοποίηση του ενζύμου πάνω στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου καθώς είχε πρώτα αναμιχθεί με το διάλυμα χιτοζάνης και Carbon Black. Γι' αυτό το σκοπό χρησιμοποιήθηκαν 3 ηλεκτρόδια άνθρακα εκ των οποίων τα δύο τροποποιήθηκαν με 2 σταγόνες των 3 μL CB σε χιτοζάνη και το τρίτο παρέμεινε ατροποποίητο.

- Ηλεκτρόδιο 1: 2 σταγόνες των 3 μL CB σε χιτοζάνη \rightarrow 2 μL 0,25% Γλουταραλδεΐδη \rightarrow 2 μL μίγματος ενζύμου (25 μL 0,1% Nafion, 25 μL 3% BSA, 16 U/mL AChE) εναποτέθηκαν στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου
- Ηλεκτρόδιο 2: στο μίγμα της χιτοζάνης με 3 mg/mL CB προστέθηκαν 16 U/mL AChE \rightarrow 2 μL αυτού του μίγματος με ένζυμο εναποτέθηκαν στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου
- Ηλεκτρόδιο 3: 10 μL από 0,02% BSA με 10 U/mL AChE εναποτέθηκαν πάνω στην επιφάνεια του σκέτου ηλεκτροδίου

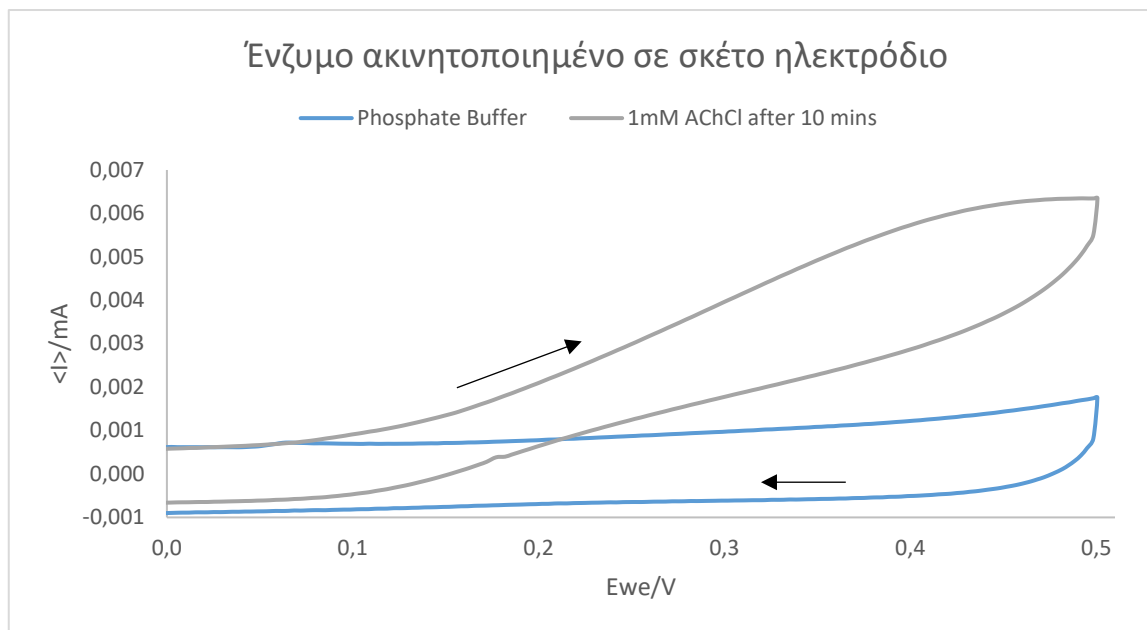
Αφού τα μίγματα με ένζυμο στέγνωσαν πάνω στις 3 επιφάνειες τα ηλεκτρόδια χαρακτηρίστηκαν με κυκλική βολταμμετρία πρώτα με 50 mM Phosphate Buffer + 0,1 M KCl με pH 7,4 και ύστερα, σταγόνα 60 μL από 10 mM υποστρώματος ακετυλοθειοχολίνης τοποθετήθηκε στις επιφάνειες. Τα δύο πρώτα ηλεκτρόδια μετρήθηκαν στα 15, 35, 60 και 75 λεπτά.



Γράφημα 66: CVs για το ηλεκτρόδιο 1 με ακίνητοποιημένο ένζυμο (16 U/mL) πάνω στην επιφάνεια CB/CS ,με Phosphate Buffer 50 mM + 0,1 M KCl και με 10 mM ακετυλοθειοχολίνη μετά από 15,35,60 και 75', με scan rate 50 mV/s



Γράφημα 67: CVs για το ηλεκτρόδιο 2 με ενσωματωμένο ένζυμο (16 U/mL) μέσα στο μίγμα CB/CS , με 10 mM ακετυλοθειοχολίνη μετά από 15,35,60 και 75', με scan rate 50 mV/s



Γράφημα 68: CVs για ηλεκτρόδιο άνθρακα με ακινητοποιημένο ένζυμο (16 U/mL), με Phosphate Buffer 50 mM με 0,1 M KCl και με 1 mM ακετυλοθειοχολίνη μετά από 10', με scan rate 50 mV/s

Από τα παραπάνω 3 γραφήματα προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα:

- 1) Όπως φαίνεται στο Γράφημα 68, το σήμα του 1 mM μετά από 10 λεπτά (γκρι γραμμή) είναι αρκετά αυξημένο σε σχέση με το αντίστοιχο του Buffer (γαλάζια γραμμή). Η κορυφή που παρουσιάζεται στα 0,35-0,4 V του διαγράμματος μετά από 10 λεπτά υποδηλώνει την παρουσία της θειοχολίνης, η οποία παράχθηκε ενζυμικά.
- 2) Παρόλο που η σκέτη επιφάνεια άνθρακα αποκρίνεται ως προς την ανίχνευση της θειοχολίνης, παρουσιάζει δύο σημαντικά μειονεκτήματα, τα οποία είναι αφενός το πολύ χαμηλό σήμα ανίχνευσης και αφετέρου, η φυσική προσρόφηση του μίγματος που περιέχει το ένζυμο πάνω στην ατροποποίητη επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Αυτός ο τρόπος εναπόθεσης είναι αρκετά ασταθής και καθόλου αναπαραγωγίσιμος. (69) Η αστάθεια αυτή οφείλεται στο ότι το ένζυμο δεν συγκρατείται από την επιφάνεια μέσω ομοιοπολικών δεσμών (ακινητοποίηση μέσω φυσικής προσρόφησης), επομένως μπορεί να απομακρυνθεί από αυτή πολύ εύκολα. Επιπλέον, η εναπόθεση του διαλύματος του ενζύμου πάνω στην επιφάνεια, προκαλεί τη μείωση της αγωγιμότητας της τελευταίας, καθώς απλά την επικαλύπτει παρεμποδίζοντας τη μεταφορά των ηλεκτρονίων κοντά στην επιφάνεια.

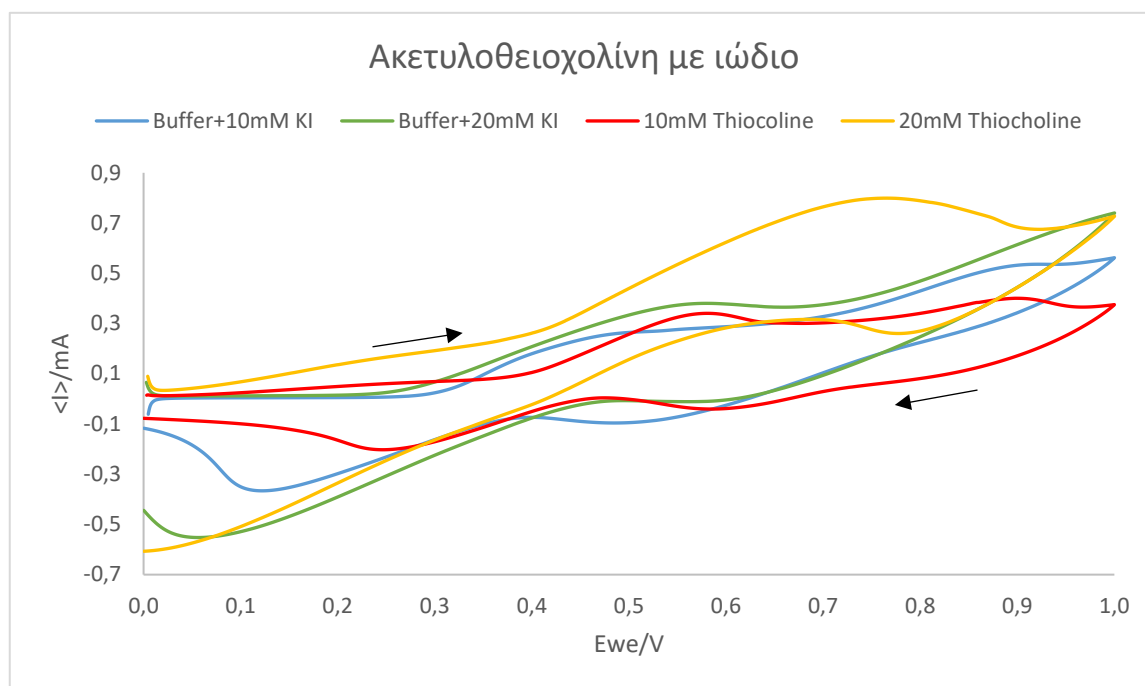
- 3) Τα διαγράμματα του Γράφημα 67 παρουσιάζουν εξαιρετικά χαμηλό σήμα όπως και στην περίπτωση που δεν υπάρχει μίγμα χιτοζάνης με CB. Ταυτόχρονα φαίνεται πως ο αισθητήρας δεν αντιλαμβάνεται την οξείδωση της θειοχολίνης. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο ότι το στρώμα χιτοζάνη-CB-ένζυμο δεν έχει επικαθήσει σωστά στην επιφάνεια και έχει ξεπλυθεί από την τοποθέτηση του Buffer. Επίσης, μπορεί να οφείλεται και στην αδυναμία του ενζύμου να δράσει προς την κατάλυση του υποστρώματος. Επομένως, αυτή η τεχνική κρίνεται ακατάλληλη για την εναπόθεση του ενζύμου στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου.
- 4) Στο Γράφημα 66, η απόκριση του αισθητήρα από τα 15 πρώτα λεπτά αποδίδει πολύ μεγαλύτερο σήμα σε αντίθεση με τα άλλα δύο γραφήματα. Ιδιαίτερα όμως μετά τη 1 ώρα, η κορυφή οξείδωσης της θειοχολίνης είναι αρκετά ξεκάθαρη λίγο μετά τα 0,35 V.
- 5) Το Γράφημα 66 αποτελεί μια ένδειξη, ακόμη, για το ότι οι αμπερομετρικές μετρήσεις ανίχνευσης της θειοχολίνης πρέπει να λαμβάνονται με εφαρμοζόμενο δυναμικό στα 0,35 V.

Επομένως, αυτό το πρωτόκολλο είναι το καταλληλότερο για την ακινητοποίηση του ενζύμου πάνω στην επιφάνεια.

7.2 Επιλογή κατάλληλου υποστρώματος

Βιβλιογραφικά, η ακετυλοχολινεστεράση καταλύει με ίδιο τρόπο το υπόστρωμα ακετυλοθειοχολίνης με χλώριο και με ιώδιο. Μέχρι στιγμής, σε όλα τα πειράματα που είχε χρησιμοποιηθεί υπόστρωμα ακετυλοθειοχολίνης με ένζυμο ή διάλυμα θειοχολίνης πάνω σε τροποποιημένο ηλεκτρόδιο άνθρακα με CB σε χιτοζάνη, το βασικό διάλυμα ήταν Phosphate Buffer με 0,1 M KCl. Για τη σύγκριση όμως των δύο υποστρωμάτων, σχεδιάστηκε ένα πείραμα όπου φτιάχτηκε διάλυμα Phosphate Buffer με 10 και 20 mM KI (Potassium Iodide) και διάλυμα ενζυμικά παραγόμενης θειοχολίνης (10 και 20 mM) από ακετυλοθειοχολίνη με ιώδιο σε Phosphate Buffer. Η συγκέντρωση της θειοχολίνης υπολογίστηκε με τη βοήθεια της χρωματομετρίας και χρησιμοποιώντας το νόμο Beer-Lambert (Εξίσωση 7).

Γι' αυτό το σκοπό τροποποιήθηκαν οι επιφάνειες 2 ηλεκτροδίων με βάση τις βέλτιστες συνθήκες που αναφέρθηκαν στο Κεφάλαιο 7, με 2 σταγόνες των 3 μL Carbon Black σε χιτοζάνη. Το ένα ηλεκτρόδιο χαρακτηρίστηκε αρχικά με Phosphate Buffer με 10 mM KI και έπειτα με 10 mM ενζυματικά παραγόμενη θειοχολίνη και το άλλο ηλεκτρόδιο χαρακτηρίστηκε αρχικά με Phosphate Buffer με 20 mM KI και έπειτα με 20 mM ενζυματικά παραγόμενη θειοχολίνη.



Γράφημα 69: CVs 2 τροποποιημένων με CB/CS ηλεκτροδίων άνθρακα, με Phosphate Buffer με 10 και 20 mM KI και με 10 και 20 mM θειοχολίνης, με scan rate 50 mV/s

Από το Γράφημα 71 εξάγονται τα εξής συμπεράσματα:

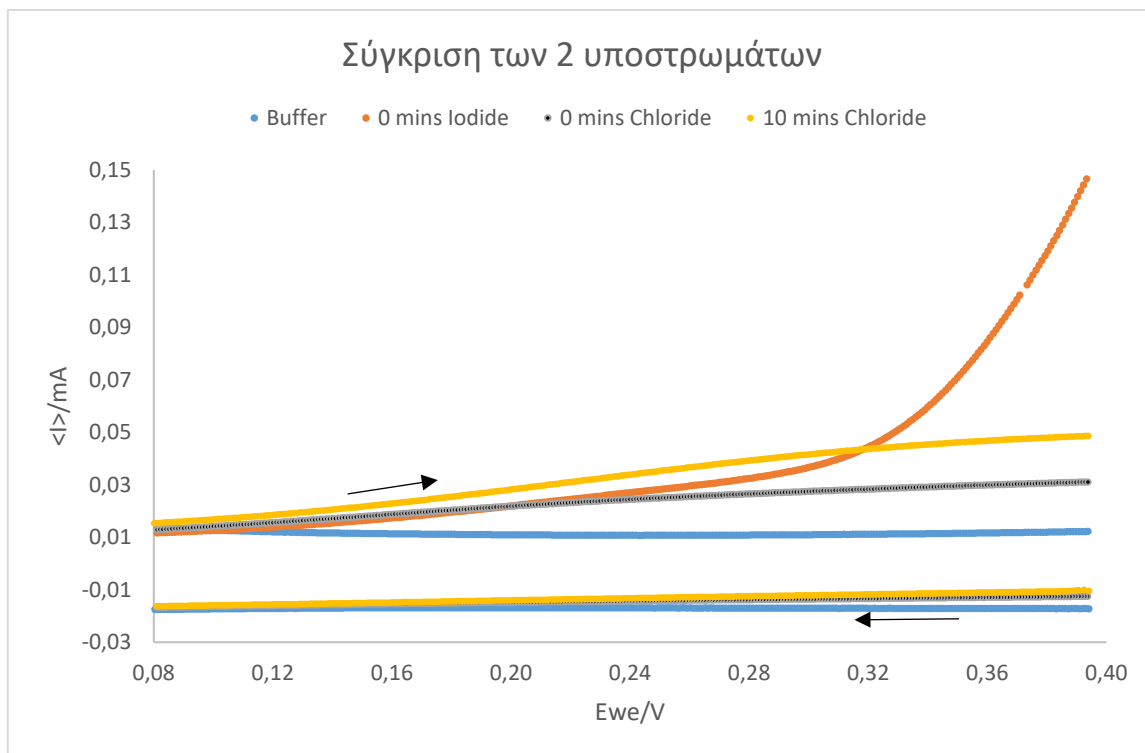
- 1) Τα σήματα που προκύπτουν είναι ψηλά σε αντίθεση με αντίστοιχα του acetylthiocholine chloride.
- 2) Η συμπεριφορά των διαγραμμάτων με Buffer και KI μόνο (μπλε και πράσινη γραμμή) είναι παραπλήσια μεταξύ τους. Κοντά στα 0,4 V παρουσιάζουν τις οξειδωαναγωγικές κορυφές που οφείλονται στο ιώδιο.
- 3) Το ίδιο παρατηρείται και στην ενζυματικά παραγόμενη θειοχολίνη στις δυο διαφορετικές συγκεντρώσεις. Για τα 10 mM το μπλε και κόκκινο διάγραμμα αντιστοιχούν στο Buffer με 10 mM KI και στη θειοχολίνη αντίστοιχα. Παρατηρείται

πως οι κορυφές που σχηματίζει το Buffer με 10 mM KI απλώς μετατοπίζονται στο διάγραμμα τηςθειοχολίνης σε ψηλότερα δυναμικά. Η ανίχνευση τηςθειοχολίνης όμως φαίνεται να πραγματοποιείται κοντά στα 0,25 V, όπου το κόκκινο διάγραμμα έχει λίγο ψηλότερο σήμα από αυτά των Buffer.

- 4) Στην περίπτωση των 20 mM, δηλαδή το πράσινο και κίτρινο διάγραμμα που αντιστοιχούν στο Buffer με 20 mM KI και στηθειοχολίνη, παρατηρείται πως η ανίχνευση τηςθειοχολίνης πραγματοποιείται ξεκάθαρα κοντά στα 0,25 V, διότι σε μεγαλύτερα δυναμικά ανιχνεύεται η επίδραση του ιωδίου.

Για τη διεξαγωγή ολοκληρωμένων συμπερασμάτων για το υπόστρωμα ακετυλοθειοχολίνης με ιώδιο, εναποτέθηκε ένζυμο 33 U/mL σε τροποποιημένη επιφάνεια άνθρακα με Carbon Black, ώστε να διαπιστωθεί αν η ενζυμική παραγωγήθειοχολίνης πάνω στην επιφάνεια επηρεάζεται από το είδος του διαλύματος. Χρησιμοποιήθηκε ένα ηλεκτρόδιο για τις ακόλουθες μετρήσεις:

- Σταθεροποίηση του στρώματος CB σε χιτοζάνη και του ακινητοποιημένου ενζύμου με αμπερομετρία στα 0,35 V με 50 mM Phosphate Buffer + 0,1M KCl, pH 7,4 για 200 sec.
- Χαρακτηρισμός του στρώματος με το ίδιο Buffer με CV (μπλε διάγραμμα στο Γράφημα 70).
- Ανίχνευση τηςθειοχολίνης που παράγεται από την ενζυμική κατάλυση 10 mM υποστρώματος ακετυλοθειοχολίνης με χλώριο στα 0 και 10'.
- Ξέπλυμα της επιφάνειας με 50 mM Phosphate Buffer + 0,1M KCl, pH 7,4 και εκ νέου χαρακτηρισμός με το ίδιο Buffer για τον έλεγχο τυχόν τροποποίησης της επιφάνειας με άλατα.
- Χαρακτηρισμός της επιφάνειας με 50 mM Phosphate Buffer + 10 mM KI, pH 7,4.
- Ανίχνευση τηςθειοχολίνης που παράγεται από την ενζυμική κατάλυση 10 mM υποστρώματος ακετυλοθειοχολίνης με ιώδιο στα 0 και 10'.



Γράφημα 70: CVs τροποποιημένου με CB/CS ηλεκτροδίου άνθρακα και 33 U/mL AChE, με 50 mM Phosphate Buffer +0,1M KCl, με 10 mM υποστρώματος με ιώδιο στα 0' και 10 mM υποστρώματος με χλώριο στα 0 και 10', με scan rate 50 mV/s

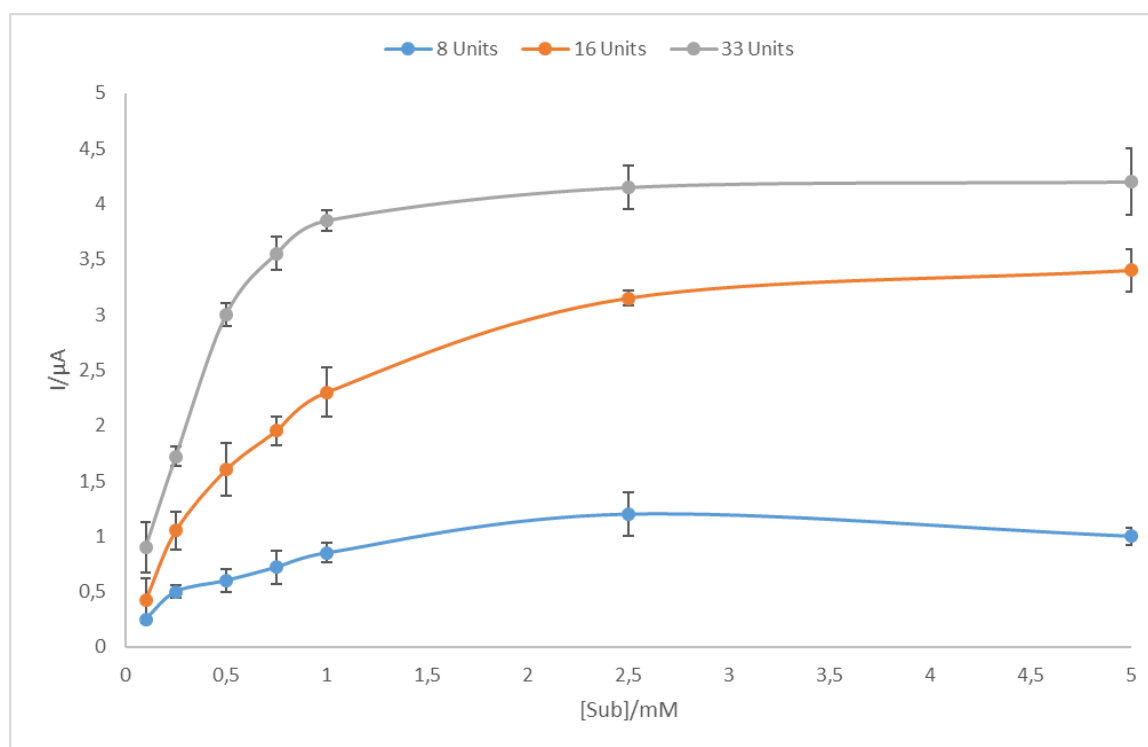
Στο Γράφημα 70, παρουσιάζεται μέρος των πειραμάτων που αναφέρονται παραπάνω σε μεγέθυνση ώστε να είναι ευδιάκριτες οι διαφορές στο παράθυρο των δυναμικών από 0,15V έως 0,4 V. Επιλέχθηκε ένα τυχαίο διάγραμμα Buffer από αυτά που μετρήθηκαν, καθώς σε αυτά τα δυναμικά, η ανίχνευση των αλάτων δεν είναι παρατηρήσιμη και τα γραφήματα συμπίπτουν μεταξύ τους. Με την κατευθείαν μέτρηση στα 0 λεπτά, του υποστρώματος με χλώριο (10 mM) ανιχνεύεται η οξείδωση της θειοχολίνης (μαύρη γραμμή) σε όλη τη μεγεθυμένη περιοχή. Το ίδιο συμβαίνει και στα 10' με μικρή αύξηση του ρεύματος χωρίς όμως ιδιαίτερη όξυνση της κορυφής. Επομένως, προκύπτει το συμπέρασμα ότι και στους δύο χρόνους είναι δυνατή η ανίχνευση της επιθυμητής ουσίας.

Από την άλλη πλευρά, με την κατευθείαν μέτρηση στα 0 λεπτά, του υποστρώματος με ιώδιο (10 mM) ανιχνεύεται η οξείδωση της θειοχολίνης (πορτοκαλί γραμμή) με μεγαλύτερη απόκριση του αισθητήρα (ψηλότερο σήμα) σε σχέση με το υπόστρωμα με χλώριο, από τα 0,23 V και πάνω. Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα πως ο αισθητήρας μπορεί να ανιχνεύσει επαρκώς τη θειοχολίνη σε ακόμη χαμηλότερο δυναμικό με το υπόστρωμα

ιωδίου και σε ακόμη μικρότερο χρόνο συγκριτικά με το υπόστρωμα που περιλαμβάνει γλώριο. Κατά συνέπεια, επιλέχθηκε το υπόστρωμα ακετυλοθειοχολίνης με ιώδιο και οι αμπερομετρικές μετρήσεις που ακολούθησαν με ένζυμο και υπόστρωμα πραγματοποιήθηκαν κοντά στα 0,3 V χωρίς αναμονή.

7.3 Εύρεση ιδανικής αναλογίας ενζύμου- υποστρώματος

Για τον υπολογισμό της βέλτιστης ποσότητας ενζύμου σε συνδυασμό με την κατάλληλη συγκέντρωση υποστρώματος, τροποποιήθηκαν 3 νέα ηλεκτρόδια άνθρακα με 2 σταγόνες των 3 μL Carbon Black σε χιτοζάνη. Μετά τη γλουταραλδεΐδη, στο ένα ηλεκτρόδιο χρησιμοποιήθηκε το μίγμα 0,1% Nafion, 3% BSA και 8 U/mL (τελική συγκέντρωση), στο άλλο χρησιμοποιήθηκε το μίγμα 0,1% Nafion, 3% BSA και 16 U/mL (τελική συγκέντρωση) και στο τρίτο χρησιμοποιήθηκε το μίγμα 0,1% Nafion, 3% BSA και 33 U/mL (τελική συγκέντρωση).



Γράφημα 71: Απόκριση για 8,16 και 33 U/mL ενζύμου με 0.1,0.25,0.5,0.75,1,2.5 και 5 mM υποστρώματος, από αμπερομετρικές μετρήσεις στα 0,25 V.

Από το Γράφημα 71, προκύπτει πως η βέλτιστη συγκέντρωση υποστρώματος και για τις τρεις ποσότητες ενζύμου είναι τα 2,5 mM καθώς σε αυτό το σημείο ξεκινάει η σταθεροποίηση της απόκρισης του αισθητήρα (πλατό). Επιπλέον, τα τρία αυτά ηλεκτρόδια που χρησιμοποιήθηκαν, φυλάχθηκαν στο ψυγείο με Phosphate Buffer και την επόμενη μέρα ξαναμετρήθηκε αμπερομετρικά η απόκριση στις διαφορετικές συγκεντρώσεις φρέσκου υποστρώματος. Το αποτέλεσμα ήταν από τη μια η μικρή πτώση του σήματος και στα 3 ηλεκτρόδια, η οποία πιθανώς οφείλεται στην πτώση της δραστηριότητας του ενζύμου. Από την άλλη, ο αισθητήρας, ανεξαρτήτως από τη συγκέντρωση ενζύμου, ανταποκρινόταν στις μεταβολές της συγκέντρωσης του υποστρώματος.

7.4 Αίχνευση φυτοφαρμάκων

Στόχος της τελικής εφαρμογής του βιοαισθητήρα είναι η ανίχνευση φυτοφαρμάκων, ιδανικά σε μικρές συγκεντρώσεις, μέσω της αναστολής του ενζύμου.

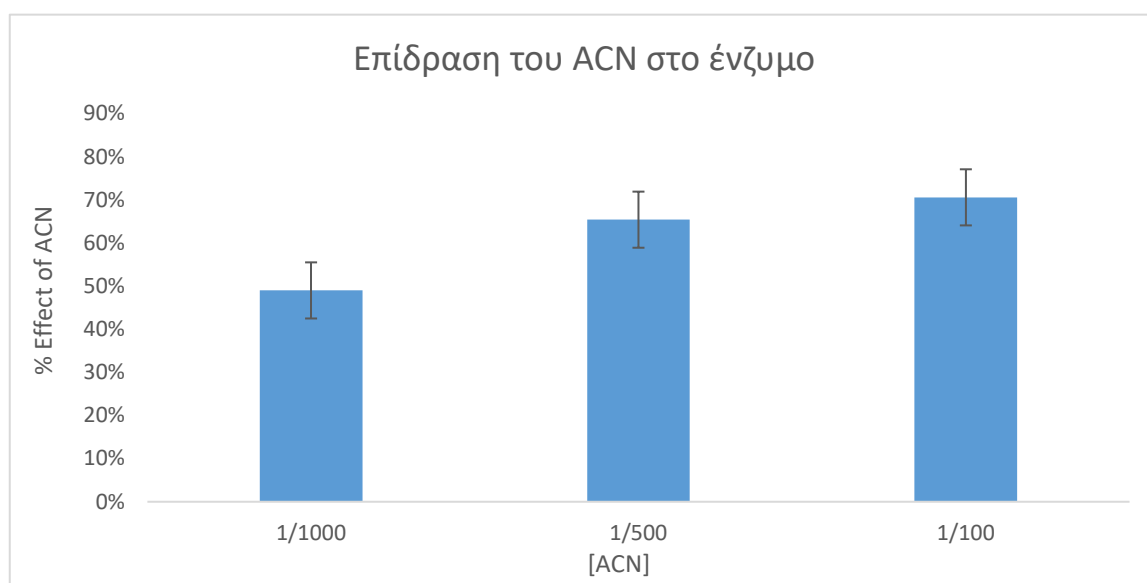
7.4.1 Επίδραση του ACN στο ένζυμο και στο στρώμα CB/CS

Όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο της χρωματομετρίας, τα φυτοφάρμακα είναι διαλυμένα σε ακετονιτρίλιο (ACN), του οποίου η συγκέντρωση μπορεί να επηρεάσει τη δραστηριότητα του ενζύμου όταν βρίσκεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις. Σε αυτά τα πλαίσια, μελετήθηκε η επίδραση μικρών συγκεντρώσεων 1/100, 1/500 και 1/1000 ακετονιτριλίου στην ευαισθησία και τη δράση του ενζύμου.

Έτσι, τροποποιήθηκαν εκ νέου τρία ηλεκτρόδια άνθρακα με 2 σταγόνες Carbon Black σε χιτοζάνη, γλουταραλδεΐδη 0,25% και με το γνωστό μίγμα με 8 U/mL ενζύμου. Έπειτα, σταθεροποιήθηκαν αμπερομετρικά με το Buffer και εναποτέθηκε 1 mM υποστρώματος ακετυλοθειοχολίνης με ιώδιο, ώστε να καταγραφεί η αρχική δράση του ενζύμου. Για κάθε ηλεκτρόδιο προέκυψαν τα εξής:

- Ηλεκτρόδιο 1: Επώση για 25' του ηλεκτροδίου με τα 8 U/mL ενζύμου, με διάλυμα 50 mM Phosphate Buffer με pH 7,4 και 1/1000 συγκέντρωση ακετονιτριλίου. Κατόπιν πραγματοποιήθηκε αμπερομετρική μέτρηση με 1 mM υποστρώματος ακετυλοθειοχολίνης, μέχρι τα 10 δευτερόλεπτα σταθεροποίησης του ρεύματος.

- Ηλεκτρόδιο 2: Επώαση για 25' του ηλεκτροδίου με τα 8 U/mL ενζύμου, με διάλυμα 50 mM Phosphate Buffer με pH 7,4 και 1/500 συγκέντρωση ακετονιτριλίου. Κατόπιν πραγματοποιήθηκε αμπερομετρική μέτρηση με 1 mM υποστρώματος ακετυλοθειοχολίνης, μέχρι τα 10 δευτερόλεπτα σταθεροποίησης του ρεύματος.
- Ηλεκτρόδιο 3: Επώαση για 25' του ηλεκτροδίου με τα 8 U/mL ενζύμου, με διάλυμα 50 mM Phosphate Buffer με pH 7,4 και 1/100 συγκέντρωση ακετονιτριλίου. Κατόπιν πραγματοποιήθηκε αμπερομετρική μέτρηση με 1 mM υποστρώματος ακετυλοθειοχολίνης, μέχρι τα 10 δευτερόλεπτα σταθεροποίησης του ρεύματος.

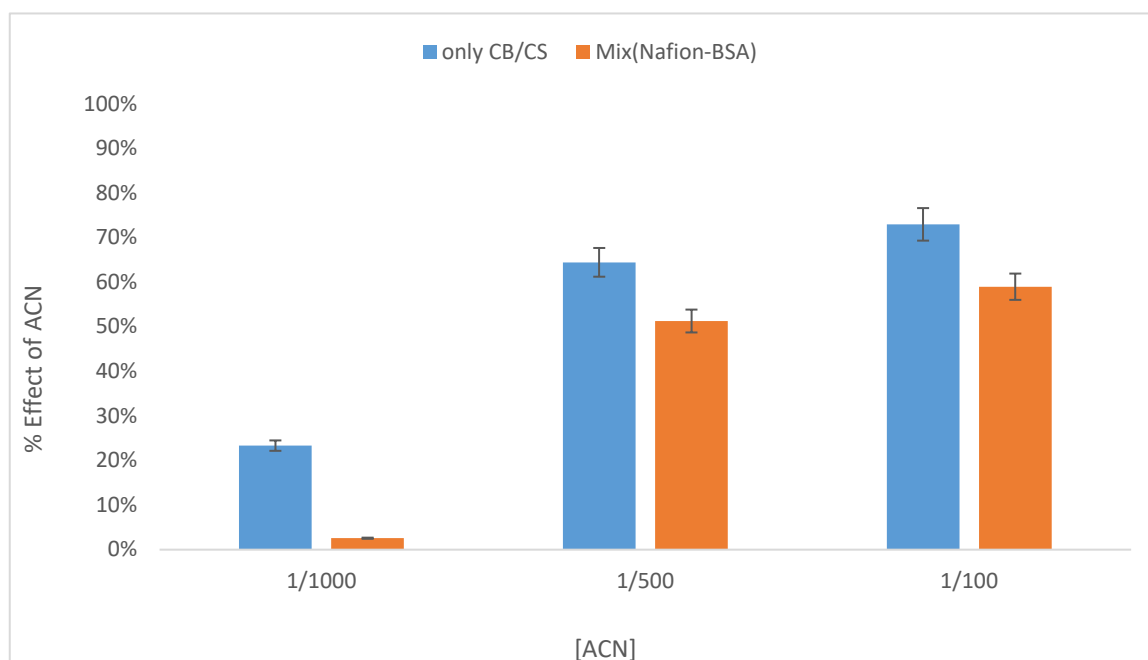


Γράφημα 72: Ποσοστιαία επίδραση της συγκέντρωσης του ACN (1/1000,1/500,1/100) στη δραστηριότητα του ενζύμου

Από το παραπάνω πείραμα, προέκυψε πως το διάλυμα του Buffer με ACN επιδρά αρνητικά στον αισθητήρα καθώς μειώνεται αρκετά το προκύπτον σήμα. Είτε επηρεάζεται αρνητικά το ακινητοποιημένο ένζυμο ή το μίγμα αυτού, είτε κατά κάποιον τρόπο βλάπτεται το στρώμα της χιτοζάνης με CB. Βέβαια, σύμφωνα με τη χρωματομετρία όπως αναφέρθηκε, συγκεντρώσεις χαμηλότερες από το 1% δεν προκαλούν μεγάλη επίδραση στο ένζυμο. Για να απαντηθεί αυτό το ερώτημα, τροποποιήθηκαν 2 νέα ηλεκτρόδια ως εξής:

- 1) Ηλεκτρόδιο 1: 2 σταγόνες των 3 μ L Carbon Black σε χιτοζάνη μόνο
- 2) Ηλεκτρόδιο 2: 2 σταγόνες των 3 μ L Carbon Black σε χιτοζάνη μόνο \rightarrow 2 μ L γλουταραλδεΐδη \rightarrow μίγμα μόνο με 0,1% Nafion και 3% BSA ()

Και τα δυο ηλεκτρόδια, αφού σταθεροποιήθηκαν αμπερομετρικά με Buffer, μετρήθηκαν με 1/1000, 1/500 και 1/100 συγκέντρωση ACN.



Γράφημα 73: Ποσοστιαία επίδραση της συγκέντρωσης του ACN (1/1000,1/500,1/100) στο στρώμα του CB σε χιτοζάνη και στο μίγμα του 0,1% Nafion-3% BSA

Τέλος, διαπιστώνεται πως το ακετονιτρίλιο, ακόμη και σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση επηρεάζει το στρώμα του Carbon Black σε χιτοζάνη, παρόλο που βιβλιογραφικά υποστηρίζεται ότι δεν επηρεάζεται η τροποποίηση της επιφάνειας με αυτόν το διαλύτη (74). Επομένως, για να επιτυγχάνεται η σωστή αξιολόγηση των αποτελεσμάτων των μετρήσεων, θα πρέπει η κατάλληλη ποσότητα ακετονιτριλίου να περιλαμβάνεται σε όλα τα διαλύματα (Buffer, υπόστρωμα, φυτοφάρμακα).

7.4.2 Ανίχνευση Carbofuran

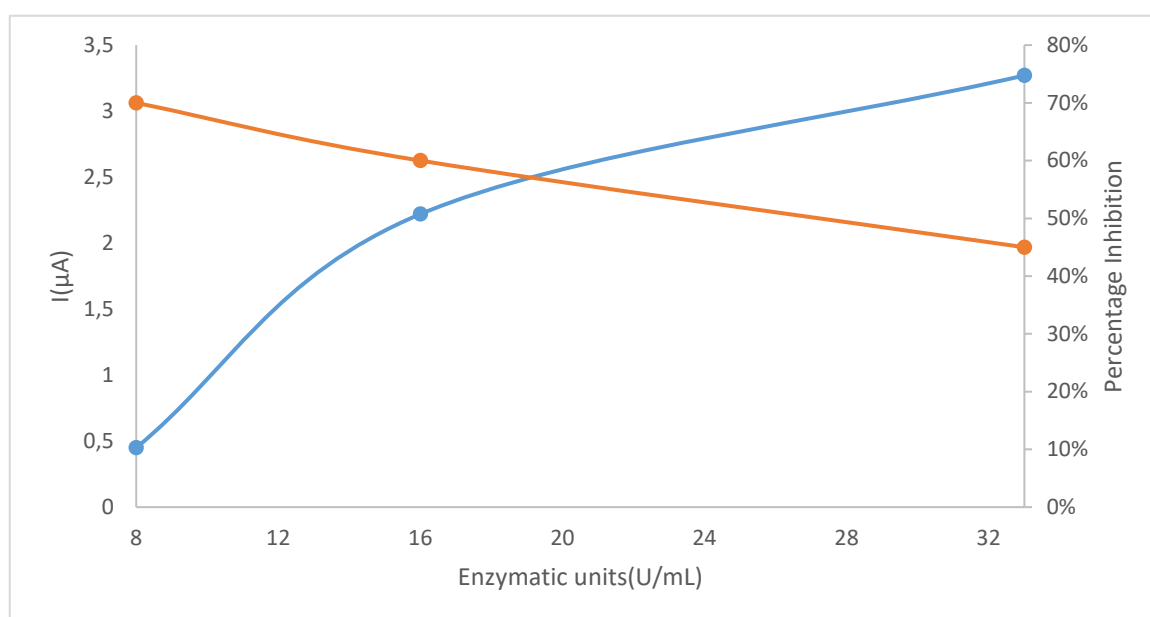
Με βάση τη χρωματομετρία, διαπιστώθηκε πως το Carbofuran προκαλεί αναστολή της AChE ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις (Γράφημα 6). Γι' αυτό το λόγο ήταν και ο πρώτος αναλύτης που χρησιμοποιήθηκε στο σύστημα του βιοαισθητήρα που σχεδιάστηκε. Λαμβάνοντας υπ' όψιν όλες τις απαραίτητες τροποποιήσεις και επεξεργασίες της επιφάνειας, καθώς και τις συγκεντρώσεις ενζύμου, υποστρώματος και ακετονιτριλίου

χρησιμοποιήθηκε μια συγκεκριμένη συγκέντρωση του φυτοφαρμάκου για την εξέταση της ποσοστιαίας αναστολής του ενζύμου.

Σε αυτό το πλαίσιο, επιλέχθηκε για το Carbofuran η συγκέντρωση των 10^{-7} M (100 nM) τελική συγκέντρωση, σε 1/100 τελική συγκέντρωση ακετονιτριλίου, για το υπόστρωμα ακετυλοθειοχολίνης με ιώδιο 2,5 mM (Γράφημα 71) και για το ένζυμο χρησιμοποιήθηκαν οι συγκεντρώσεις 8,16 και 33 U/mL.

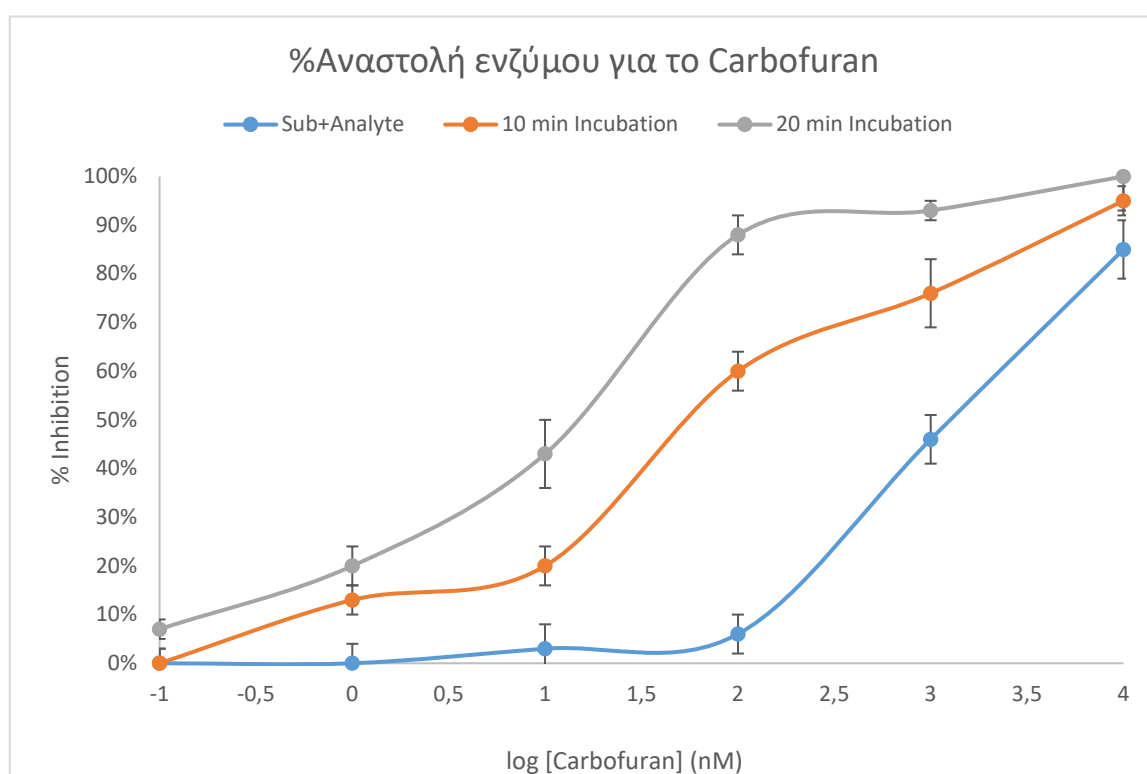
Χρησιμοποιώντας το ήδη εφαρμοζόμενο πρωτόκολλο για την τροποποίηση τριών επιφανειών άνθρακα με Carbon Black σε χιτοζάνη, ακινητοποιήθηκε το ένζυμο στις 3 συγκεντρώσεις και έπειτα ο βιοαισθητήρας σταθεροποιήθηκε με χρονοαμπερομετρία. Και στα τρία ηλεκτρόδια, μετρήθηκε η αρχική δράση του ενζύμου με 2,5 mM υπόστρωμα ακετυλοθειοχολίνης με ιώδιο, συμπεριλαμβανομένου και του 1% ακετονιτριλίου στο διάλυμα.

Έπειτα, τοποθετήθηκε σταγόνα 60 μ L Carbofuran με συγκέντρωση 10^{-7} M μέσα σε διάλυμα υποστρώματος 2,5 mM και 1% ACN και αμέσως λήφθηκε αμπερομετρικά το σήμα μέχρι τα 200 sec που σταθεροποιήθηκε η τιμή του ρεύματος (αριστερός ψ άξονας στο Γράφημα 74). Για τον υπολογισμό της ποσοστιαίας αναστολής του ενζύμου χρησιμοποιήθηκε η Εξίσωση 8, όπου ως αρχική δραστηριότητα τέθηκε η αρχική τιμή που λήφθηκε για τα 2,5 mM υποστρώματος με 1% ACN και ως τελική αυτή που προέκυψε μετά την εισαγωγή του αναλύτη.



Γράφημα 74: Απόκριση του βιοαισθητήρα σε 2,5 mM υποστρώματος ιωδίου σε 1% ACN και 10^{-7} M Carbofuran (ποσοστιαία αναστολή) ως συνάρτηση της ποσότητας του ενζύμου

Από το παραπάνω γράφημα, προέκυψε πως η ιδανική συγκέντρωση ενζύμου για 2,5 mM υποστρώματος και για 10^{-7} M Carbofuran είναι περίπου 18 U/mL ως τελική συγκέντρωση. Σε επόμενο στάδιο, μελετήθηκε η αναστολή του ενζύμου από διάφορες συγκεντρώσεις του Carbofuran και υπό τρεις διαφορετικές συνθήκες. Στην πρώτη περίπτωση, ο αναλύτης χωρίς να επωασθεί με το ένζυμο τοποθετείται στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου μαζί με το διάλυμα του υποστρώματος. Στη δεύτερη περίπτωση, ο αναλύτης επωάζεται για 10' μαζί με το ένζυμο και ύστερα λαμβάνεται το αμπερομετρικό σήμα με 2,5 mM υποστρώματος. Στην τρίτη περίπτωση επαναλαμβάνεται το ίδιο με τη διαφορά ότι ο χρόνος επώασης είναι 20'.



Γράφημα 75: Ποσοστιαία αναστολή του ενζύμου (16 U/mL) για διάφορες συγκεντρώσεις Carbofuran ($10^{-10}, 10^{-9}, 10^{-8}, 10^{-7}, 10^{-6}, 10^{-5}$ M), με 2,5 mM υποστρώματος σε 1% ACN, αμπερομετρικές μετρήσεις με 0,25V.

Από το Γράφημα 75, προκύπτει πως το ένζυμο όταν δεν επωάζεται με τον αναλύτη δεν αναστέλεται σε μεγάλο ποσοστό στην περίπτωση των χαμηλών συγκεντρώσεων. Η ποσοστιαία αναστολή προκύπτει να είναι ανιχνεύσιμη σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αναλύτη. Αντίθετα, ύστερα από επώαση 10 λεπτών, στις ίδιες συγκεντρώσεις του αναλύτη φαίνεται πως η ποσοστιαία αναστολή του ενζύμου είναι μεγαλύτερη. Ειδικά όμως στην

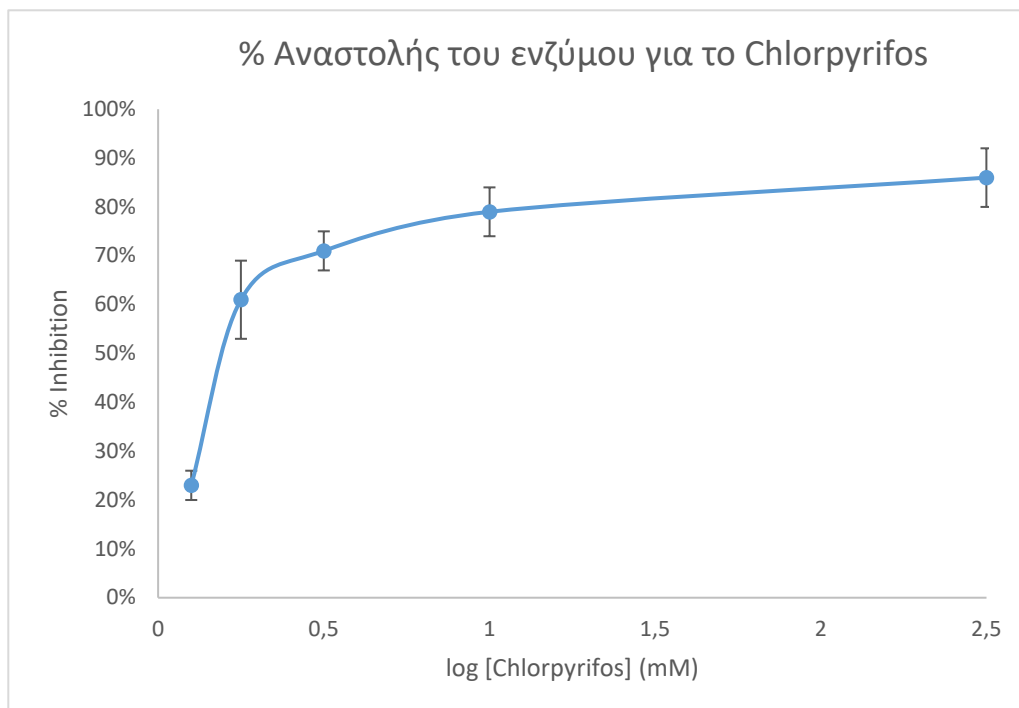
περίπτωση των 20 λεπτών, πλέον οι χαμηλές συγκεντρώσεις είναι ικανές να προκαλέσουν ανιχνεύσιμη αναστολή του ενζύμου.

Δεδομένου ότι το Carbofuran προκαλεί αναστρέψιμη αναστολή του ενζύμου, δοκιμάστηκε η επανενεργοποίησή του τελευταίου με τη βοήθεια ξεπλυμάτων με αρκετή ποσότητα Phosphate Buffer μετά τη λήξη των μετρήσεων με την καρβαμική ένωση. Επιλέχθηκε τυχαία ένα ηλεκτρόδιο με 16 U/mL AChE, όπου το αρχικό σήμα με 2,5 mM υποστρώματος με 1% ACN ήταν 2,9 μ A και ύστερα από την αναστολή του ενζύμου με 10^{-6} M συγκέντρωση αναλύτη, το σήμα που προέκυψε με 2,5 mM υποστρώματος με 1% ACN ήταν 1,14 μ A. Μετά από αρκετά ξεπλύματα με Phosphate Buffer, το σήμα της αμπερομετρικής μέτρησης για την ίδια συγκέντρωση υποστρώματος ήταν 2,8 μ A, δηλαδή το ένζυμο απέκτησε ξανά τη δραστηρότητά του στο 98%.

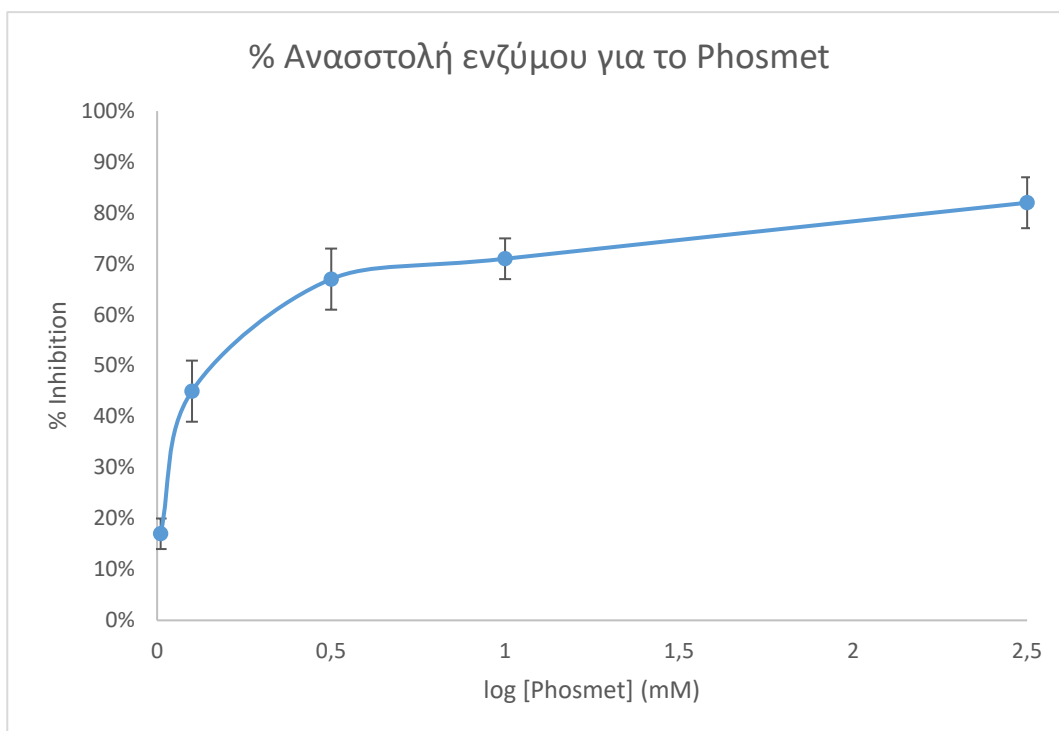
7.4.3 Ανίχνευση Chlorpyrifos και Phosmet

Σύμφωνα με το πείραμα της χρωματρίας, οι άλλοι δύο αναλύτες που χρησιμοποιήθηκαν, το phosmet και το chlorpyrifos, δεν μπόρεσαν να ανιχνευθούν σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις από το ελεύθερο σε διάλυμα ένζυμο. Λαμβάνοντας υπ' όψιν την περιορισμένη ανίχνευση χαμηλών συγκεντρώσεων των οραγοφωσφορικών αυτών ενώσεων, δοκιμάστηκε η ανίχνευση τους με τον βιοαισθητήρα που σχεδιάστηκε εφαρμόζοντας τα 20' ως χρόνο επώασης της ουσίας με το ένζυμο πριν τη μέτρηση. Κι αυτό γιατί όσο περισσότερο χρόνο διατηρείται το διάλυμα στην επιφάνεια με το ακινητοποιημένο ένζυμο, τόσο περισσότερο αυξάνεται η αναστολή αυτού, ειδικά στις χαμηλές συγκεντρώσεις. (74)

Επομένως, διατηρώντας τα στάδια της τροποποίησης της επιφάνειας των ηλεκτροδίων άνθρακα σταθερά, μετρήθηκε η αρχική απόκριση του ενζύμου με 2,5 mM υποστρώματος με 1% ACN κι έπειτα ακολούθησε για 20 λεπτά επώαση του κάθε ηλεκτροδίου με 16 U/mL ένζυμο με την αντίστοιχη συγκέντρωση αναλύτη πριν την τελική αμπερομετρική μέτρηση με υπόστρωμα. Οι συγκεντρώσεις που ανιχνεύθηκαν για το chlorpyrifos ήταν 2.5,1,0.5, 0.25 και 0.1 mM, ενώ για το phosmet ήταν 2.5,1,0.5,0.1 και 0.01 mM.



Γράφημα 76: Ποσοστιαία αναστολή του ενζύμου (16 U/mL) για διάφορες συγκεντρώσεις Chlorpyrifos (2.5, 1, 0.5, 0.25 και 0.1 mM), με 2,5 mM υποστρώματος σε 1% ACN, αμπερομετρικές μετρήσεις με 0,25V



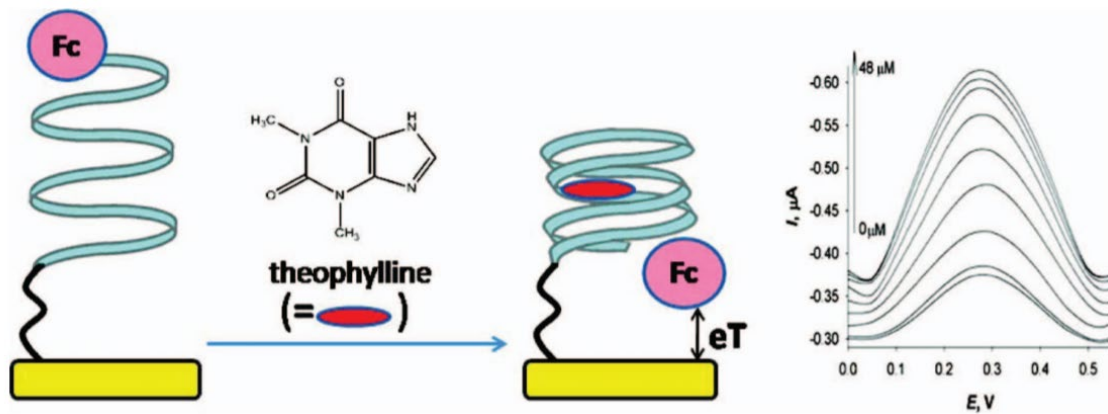
Γράφημα 77: Ποσοστιαία αναστολή του ενζύμου (16 U/mL) για διάφορες συγκεντρώσεις Phosmet (2.5, 1, 0.5, 0.1 και 0.01 mM), με 2,5 mM υποστρώματος σε 1% ACN, αμπερομετρικές μετρήσεις με 0,25V

Όπως παρατηρείται από τα δύο παραπάνω γραφήματα (Γράφημα 76 και Γράφημα 77), οι συγκεντρώσεις που ανιχνεύονται για το chlorpyrifos και το phosmet είναι της τάξης των mM, πολύ μεγαλύτερες δηλαδή από τις αντίστοιχες του carbofuran (nM). Εκτός από το γεγονός ότι προκαλούν διαφορετικού τύπου αναστολή στο ένζυμο, προκύπτει το συμπέρασμα ότι πλέον η ευαισθησία στην ανίχνευση αυτών των ουσιών δεν εξαρτάται τόσο από την τροποποίηση της επιφάνειας αλλά από την ικανότητα του φυτοφαρμάκου να παρεμποδίζει το ίδιο το ένζυμο.

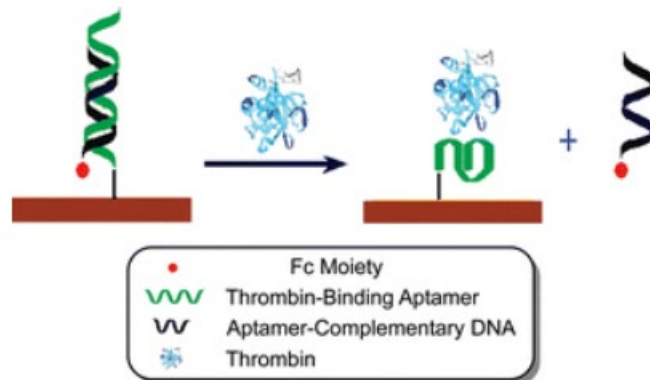
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΧΗΜΙΚΗΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗΣ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΩΝ ΧΡΥΣΟΥ ΜΕ ΑΠΤΑΜΕΡΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΦΘΑΛΙΚΩΝ ΕΣΤΕΡΩΝ

Όπως έχει αναφερθεί και στο θεωρητικό μέρος αυτής της εργασίας, η ανίχνευση των φθαλικών εστέρων μπορεί να επιτευχθεί με τη βοήθεια απταμερών χάρη στην επιλεκτική πρόσδεση των δακτυλίων των φθαλικών εστέρων με τις αζωτούχες βάσεις του απταμερούς. Για το πειραματικό μέρος της ανίχνευσης τέτοιων ουσιών χρησιμοποιήθηκαν ηλεκτρόδια χρυσού, καθαρισμένα με ηλεκτροχημικό τρόπο. Βέβαια, η πρόσδεση του αναλύτη στη δομή του απταμερούς δεν παράγει ηλεκτρικό φορτίο γι'αυτό και μέθοδοι όπως η Κυκλική Βολταμετρία, δεν είναι οι πλέον κατάλληλες για το σκοπό αυτό. Για τη χρήση τεχνικών οι οποίες βασίζονται στη μεταβολή του ρεύματος στο ηλεκτρόδιο κατά την πρόσδεση του αναλύτη απαιτείται είτε η σήμανση του απταμερούς με ένα ηλεκτρο-ενεργό μόριο (όπως το Methylene Blue και το Ferrocene), είτε η χρήση μιας συμπληρωματικής αλληλουχίας προς το απταμερές, η οποία επίσης φέρει ένα ηλεκτροενεργό μόριο.

Στην πρώτη περίπτωση, η αναγνώριση του αναλύτη από το ακινητοποιημένο απταμερές προκαλεί μια μεταβολή στην τρισδιάστατη δομή του απταμερούς και οδηγεί στην απομάκρυνση από ή την καλύτερη επαφή του ηλεκτρο-ενεργού μορίου με την επιφάνεια του ηλεκτροδίου και κατά συνέπεια σε μείωση ή αύξηση του ρεύματος αντίστοιχα. Ένα τέτοιο παράδειγμα απεικονίζεται σχηματικά στην Εικόνα 56. Στην περίπτωση χρήσης μιας συμπληρωματικής αλυσίδας, η αναγνώριση του αναλύτη οδηγεί στην απομάκρυνσή της και κατά συνέπεια σε μείωση του ρεύματος (Εικόνα 57). Και οι δύο αυτές τεχνικές έχουν σημαντικά μεγαλύτερο κόστος λόγω της σήμανσης που απαιτείται, αλλά κυρίως αλλάζουν σημαντικά την ικανότητα του απταμερούς να αναγνωρίζει και να δημιουργεί δεσμούς επιλεκτικά με τον αναλύτη για τον οποίο έχει επιλεγθεί μέσω της διαδικασίας του SELEX.

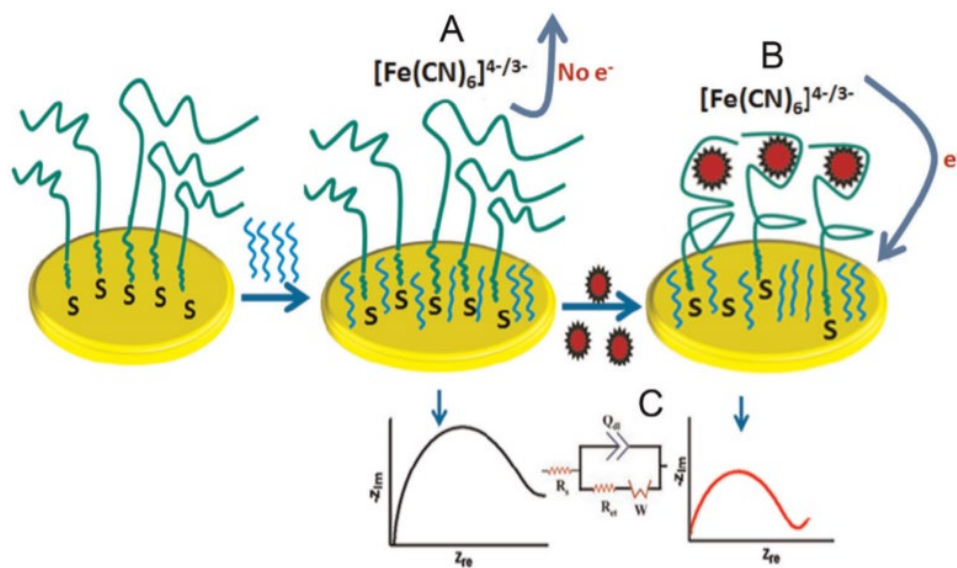


Εικόνα 56: Σχηματική αναπαράσταση ενός ηλεκτροχημικού αισθητήρα που βασίζεται σε απταμερές, για την ανίχνευση της θεοφυλλίνης με τη χρήση του Ferrocene ως οξειδωαναγωγική ετικέτα του απταμερούς (89)



Εικόνα 57: Σχηματική απεικόνιση της μετατόπισης του συμπληρωματικού κλώνου λόγω της πρόσδεσης του αναλύτη με το απταμερές (96)

Εναλλακτικά, η πρόσδεση του αναλύτη στο απταμερές μπορεί να ανιχνευθεί και με ευαίσθητες τεχνικές, όπως η εμπέδηση (EIS), που δεν βασίζονται στη μεταβολή του ρεύματος στην επιφάνεια, ενώ είναι ικανές να παρακολουθήσουν μικρές μεταβολές στις διεπιφάνειες που προκαλούνται ακόμη και από αναλύτες μικρού μοριακού βάρους, όπως στη συγκεκριμένη περίπτωση οι φθαλικοί εστέρες (Εικόνα 58). Αποφεύγοντας, λοιπόν, τα περίπλοκα στάδια της σήμανσης, το κόστος του βιοαισθητήρα μειώνεται και η ανάλυση μπορεί να πραγματοποιηθεί σε μικρότερο χρονικό διάστημα με τη χρήση του στόχου και του βιοϋποδοχέα στη φυσική τους μορφή. (86)



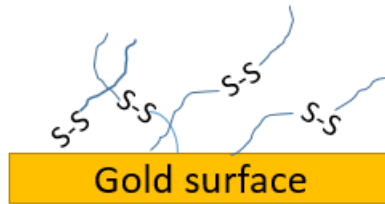
Εικόνα 58: Σχηματική απεικόνιση της αρχής διευκόλυνσης της μεταφοράς φορτίου που προκαλείται από την πρόσδεση του απταμερούς με τον αναλύτη (88)

Στην παρούσα εργασία, διερευνήθηκε η δυνατότητα ανίχνευσης δύο πολύ συχνά απαντώμενων φθαλικών εστέρων (DEHP (2-ethylhexyl phthalate) και DINP (Diisononyl phthalate)) με τη χρήση εμπέδησης. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το απταμερές που έχει επιλεγεί για να προσδένεται με το δακτύλιο του DEHP (7).

Ως βιολογικά μόρια, τα απταμερή είναι εξαιρετικά ευαίσθητα στις συγκεντρώσεις των αλάτων που περιέχει το Immobilization Buffer στο οποίο διαλύονται, αλλά και το Binding Buffer στο οποίο δρουν και προσδένονται με τον αναλύτη. Το Immobilization Buffer περιλαμβάνει 10 mM Phosphate Buffer με pH 7,4 +1M NaCl και το Binding Buffer περιλαμβάνει 100mM NaCl, 20 mM Tris, 2 mM MgCl₂, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂ και 1% Tween 20. Επίσης, ο χαρακτηρισμός των επιφανειών των ακινητοποιημένων απταμερών πραγματοποιήθηκε με 5 mM K₃Fe(CN)₆ - K₄Fe(CN)₆ στο κατάλληλο, ανάλογα με την επιφάνεια, Buffer.

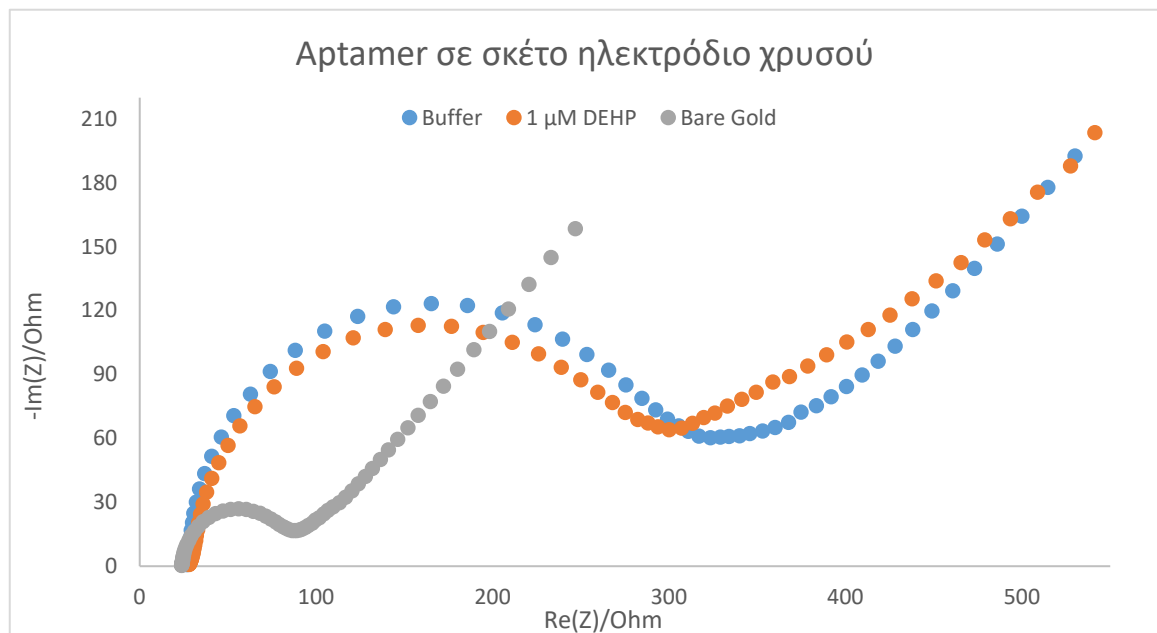
Μετά την παρασκευή των κατάλληλων Buffers, ακολούθησε η προσπάθεια ακινητοποίησης των απταμερών στην ηλεκτροχημικά καθαρισμένη επιφάνεια ενός ηλεκτροδίου χρυσού, μέσω προσρόφησης (Εικόνα 59). Στόχο αυτής της μεθόδου αποτέλεσε η μελέτη της αλλαγής της εμπέδησης της επιφάνειας, η οποία εξαρτάται αποκλειστικά από τη συγγένεια της αλληλεπίδρασης μεταξύ του απταμερούς (βιοϋποδοχέας) και του αναλύτη (DEHP). Η χρήση μη επισημασμένων απταμερών και η ακινητοποίησή τους

απευθείας στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου, αυξάνει τη διατήρηση της υψηλής συγγένειας και μειώνει τις μη ειδικές προσροφήσεις του αναλύτη στο απταμερές. (87)



Εικόνα 59: Σχηματική απεικόνιση της φυσικής προσρόφησης των απταμερών πάνω στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου χρυσού.

Στα πλαίσια αυτά, το ηλεκτρόδιο χρυσού χαρακτηρίστηκε πρώτα ως προς την εμπέδηση του με 5 mM $K_3Fe(CN)_6 - K_4Fe(CN)_6$ σε Phosphate Buffer. Στάχθηκε στην επιφάνεια 1 μM τελική συγκέντρωση των απταμερών σε Immobilization Buffer και ύστερα το ηλεκτρόδιο τοποθετήθηκε σε humid chamber στο ψυγείο για όλο το βράδυ. Την επόμενη μέρα, η επιφάνεια ξεπλύθηκε πολύ προσεκτικά με Immobilization Buffer και χαρακτηρίστηκε εκ νέου ως προς την εμπέδηση της με 5 mM $K_3Fe(CN)_6 - K_4Fe(CN)_6$ σε Phosphate Buffer. Έπειτα, εναποτέθηκε σταγόνα των 60 μL από 1 μM DEHP διαλυμένο σε Binding Buffer με 1% ACN για 30' πάνω στην επιφάνεια και αφού ξεπλύθηκε με Binding Buffer χαρακτηρίστηκε ξανά με 5 mM $K_3Fe(CN)_6 - K_4Fe(CN)_6$ σε Phosphate Buffer.



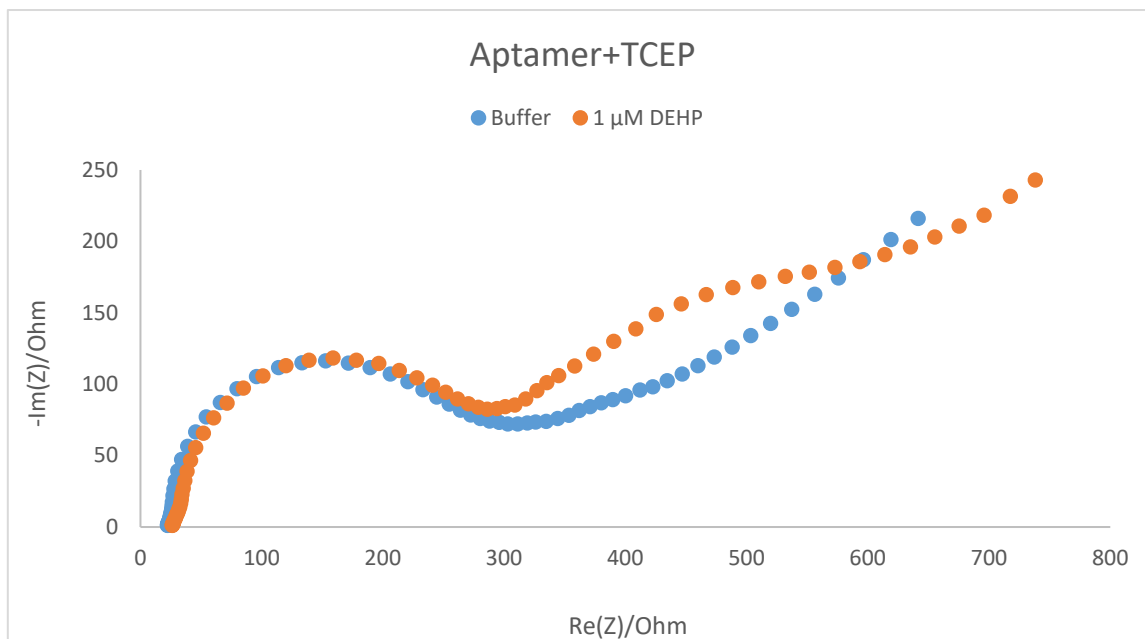
Γράφημα 78: Σύγκριση της εμπέδησης σε καθαρό ηλεκτρόδιο χρυσού και σε επιφάνεια με ακινητοποιημένα απταμερή (1 μM) πριν και μετά το 1 μM DEHP. Ο χαρακτηρισμός έγινε σε 5 mM $K_3Fe(CN)_6 - K_4Fe(CN)_6$ σε Phosphate Buffer

Για να προσδεθούν τα απταμερή στην επιφάνεια χρυσού, απαιτείται αρκετός χρόνος. Γι'αυτό το λόγο, το διάλυμα απταμερών έμεινε στη επιφάνεια χρυσού όλη τη νύχτα σε υγρασία. Στο Γράφημα 78, παρουσιάζεται αύξηση της εμπέδησης της επιφάνειας με την ακινητοποίηση των απταμερών σε αυτή έναντι του σκέτου ηλεκτροδίου. Θεωρητικά, με την πρόσδεση του αναλύτη στο απταμερές, αναμένεται είτε να αυξάνεται η εμπέδηση είτε να αλλάζει μορφή το διάγραμμα καθώς θα μεταβάλλεται η διάταξη του απταμερούς στο χώρο.

Μετά την επώαση του αισθητήρα με το 1 μM DEHP, παρατηρείται πολύ μικρή αλλαγή στο γραμμικό μέρος του πορτοκαλί διαγράμματος (Γράφημα 78) που αφορά τη διαδικασία περιορισμένης διάχυσης. Αντίθετα, το ημικόκλιο που αφορά τη μεταφορά ηλεκτρονίων του οξειδωαναγωγικού ζεύγους που χρησιμοποιείται είναι παρόμοιο απουσία και παρουσία του αναλύτη. Επομένως, προκύπτει το συμπέρασμα ότι δεν είναι ανιχνεύσιμη η πρόσδεση του DEHP με το απταμερές, ενδεχομένως εξαιτίας της άτακτης διάταξης του τελευταίου στη επιφάνεια.

Για την επίλυση αυτού του ζητήματος, δοκιμάστηκε πριν την ακινητοποίηση των απταμερών, η ανάμειξη τους με TCEP, ενός αναγωγικού παράγοντα που σπάει τους δισουλφιδικούς δεσμούς του απταμερούς και επιτρέπει την χημική προσρόφησή του στην επιφάνεια. Η συγκέντρωσή του ήταν 200 μM και αναμείχθηκε για 30' με το διάλυμα των απταμερών. Το προκύπτον μίγμα θερμάνθηκε στους 95 $^{\circ}\text{C}$ για 10' και αμέσως ψύχθηκε για ακόμη 10'. Από το μίγμα απταμερούς-TCEP, σταγόνα των 7 μL τοποθετήθηκε στην επιφάνεια ηλεκτροχημικά καθαρισμένου ηλεκτροδίου χρυσού, το οποίο αφέθηκε μια ημέρα στο ψυγείο σε περιβάλλον υγρασίας (humid chamber).

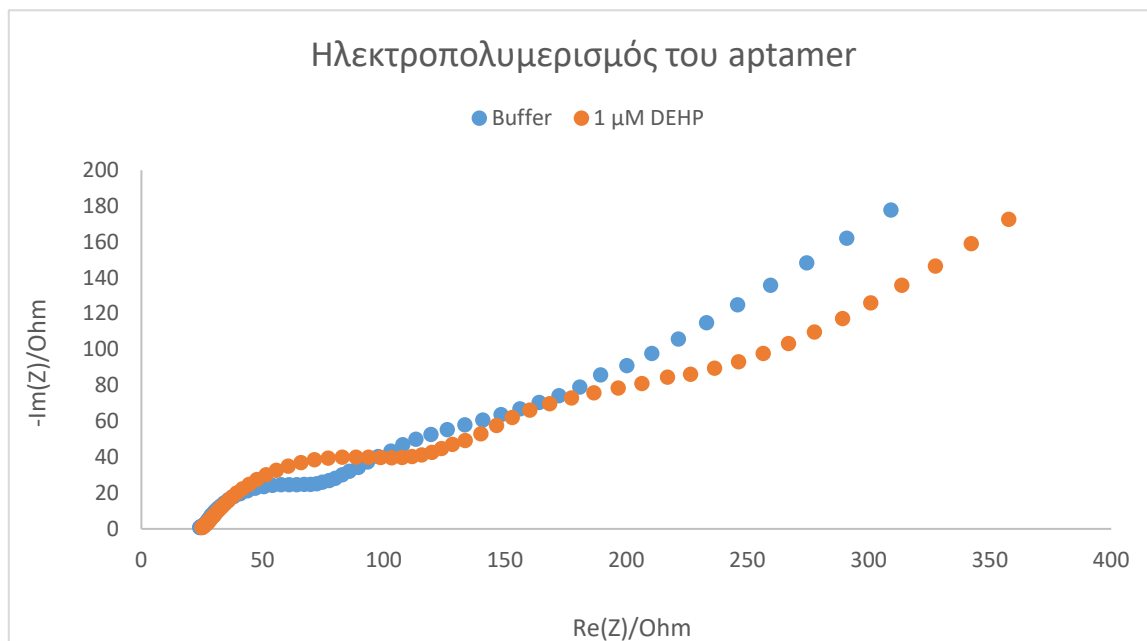
Την επόμενη μέρα, η επιφάνεια ξεπλύθηκε πολύ προσεκτικά με Immobilization Buffer και χαρακτηρίστηκε ως προς την εμπέδηση της με 5 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ - $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ σε Phosphate Buffer. Έπειτα, εναποτέθηκε σταγόνα των 60 μL από 1 μM DEHP διαλυμένο σε Binding Buffer με 1% ACN για 30' πάνω στην επιφάνεια και αφού ξεπλύθηκε με Binding Buffer χαρακτηρίστηκε ξανά με 5 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ - $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ σε Phosphate Buffer.



Γράφημα 79: Εμπέδηση σε επιφάνεια χρυσού με 1 μM απταμερή μαζί με 200 μM TCEP πριν και μετά το 1 μM DEHP. Ο χαρακτηρισμός έγινε σε 5 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6 - \text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ σε Phosphate Buffer

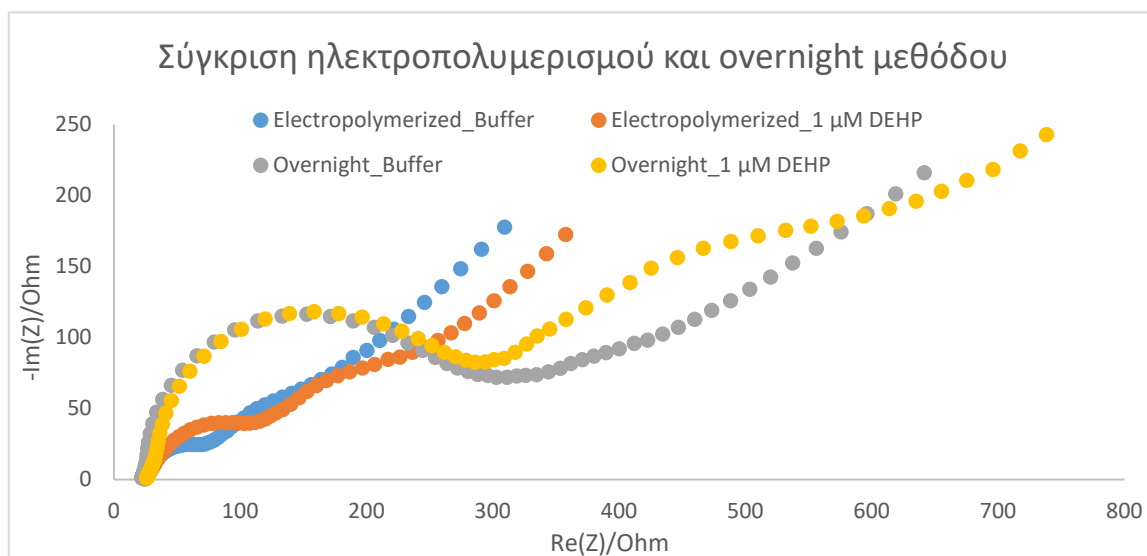
Από το Γράφημα 79, προκύπτει πως με αυτή την τεχνική η μεταφορά των ηλεκτρονίων του οξειδωαναγωγικού ζεύγους προς την επιφάνεια είναι παρόμοια με την προηγούμενη στην απουσία του αναλύτη. Μετά την επώαση της επιφάνειας όμως με 1 μM DEHP, παρατηρείται ο σχηματισμός ενός μικρού δεύτερου ημικυκλίου, ο οποίος υποδηλώνει πρόσδεση του αναλύτη με το απταμερές και άρα παρεμπόδιση της διάχυσης.

Ταυτόχρονα με τη μέθοδο της χημειορρόφησης εξετάστηκε και η τεχνική ηλεκτροπολυμερισμού του μίγματος απταμερούς με TCEP σε ίδιες συγκεντρώσεις πάνω στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Για τον ηλεκτροπολυμερισμό, 50 μL του μίγματος εναποτέθηκαν στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου και με αμπερομετρία, εφαρμόστηκε αναγωγικό δυναμικό (-1.2 V) για 3'. Έπειτα, χωρίς να ξεπλυθεί, η επιφάνεια επώαστηκε με αυτό το διάλυμα για 30' σε περιβάλλον υγρασίας. Στη συνέχεια, ξεπλύθηκε προσεκτικά με το Immobilization Buffer και χαρακτηρίστηκε με 5 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6 - \text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ σε Phosphate Buffer. Τέλος, εναποτέθηκε σταγόνα των 60 μL από 1 μM DEHP διαλυμένο σε Binding Buffer με 1% ACN για 30' πάνω στην επιφάνεια και αφού ξεπλύθηκε με Binding Buffer χαρακτηρίστηκε ξανά.



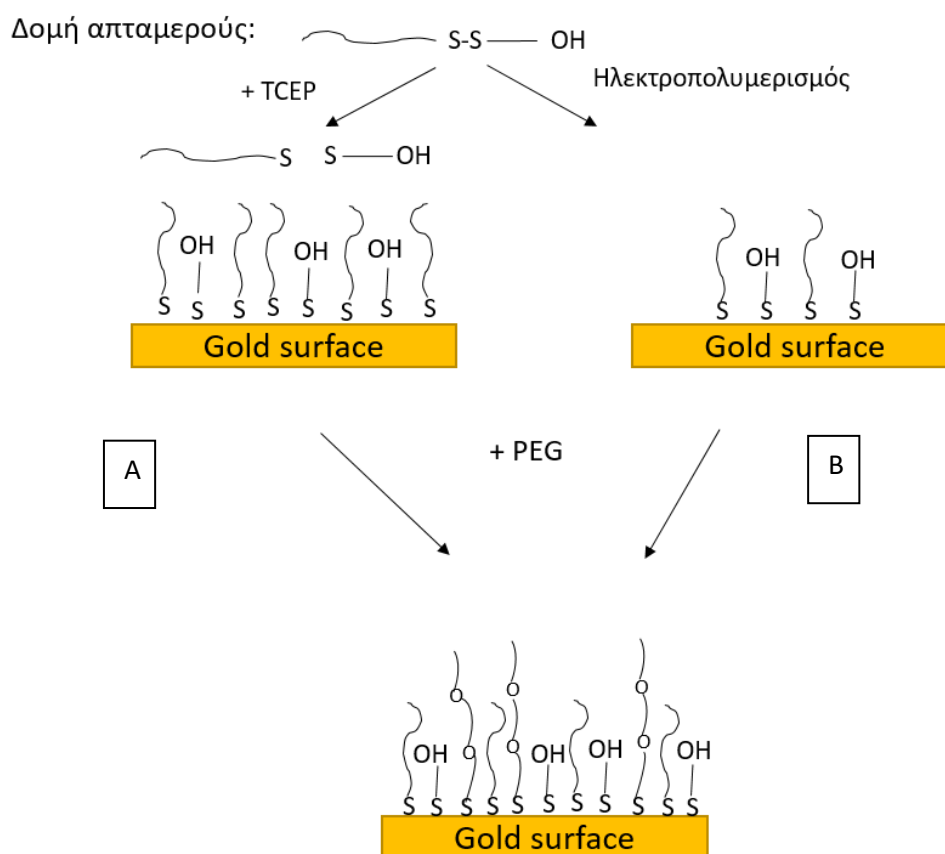
Γράφημα 80: Εμπέδηση σε επιφάνεια χρυσού με ηλεκτροπολυμερισμένο μίγμα 1 μM απταμερούς με 200 μM TCEP, πριν και μετά το 1 μM DEHP. Ο χαρακτηρισμός έγινε σε 5 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ - $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ σε Phosphate Buffer

Και σε αυτό το γράφημα (Γράφημα 80), με την παρουσία του αναλύτη παρατηρείται ο σχηματισμός ενός δεύτερου ημικυκλίου. Η εμπέδηση είναι συνολικά μειωμένη σε σχέση με τις προηγούμενες δύο τεχνικές και αυτό σημαίνει πως ελάχιστη ποσότητα απταμερούς έχει ακινητοποιηθεί στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου, επομένως διευκολύνεται η μεταφορά φορτίων προς αυτή.



Γράφημα 81: Σύγκριση του ηλεκτροπολυμερισμού και της over night εναπόθεσης μίγματος 1 μM απταμερούς με 200 μM TCEP, πριν και μετά το 1 μM DEHP. Ο χαρακτηρισμός έγινε σε 5 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ - $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ σε Phosphate Buffer

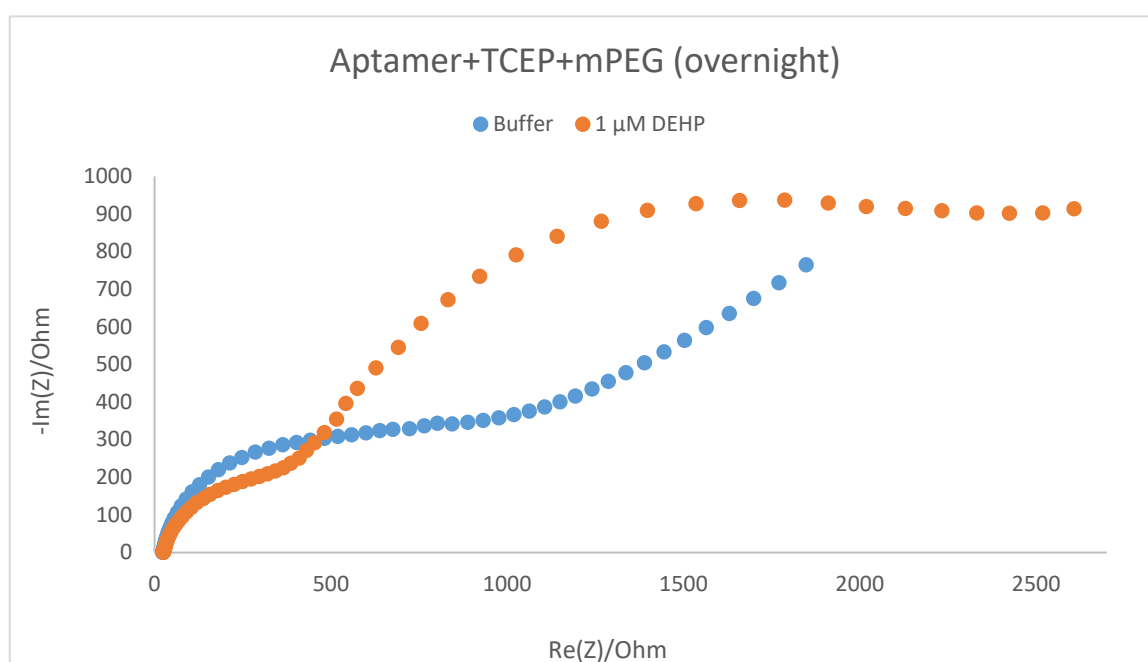
Στο Γράφημα 81, αναδεικνύεται η πιο αυξημένη εμπέδηση της επιφάνειας στην περίπτωση της over night εναπόθεσης του μίγματος απταμερούς-TCEP σε αυτή. Η διαφορά των δύο μεθόδων πιθανώς οφείλεται στο χρόνο που διατίθεται στο απταμερές να αναπτύξει χημικούς δεσμούς με την επιφάνεια. Η μικρότερη συγκέντρωση ακινητοποιημένου απταμερούς συνεπάγεται αυτόματα την πρόσδεση λιγότερου αναλύτη, άρα η τεχνική αυτή δε μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση των φθαλικών ενώσεων. Και στις δύο περιπτώσεις, είτε με χημικό τρόπο χάριν στο TCEP είτε με την εφαρμογή δυναμικού κατά τον ηλεκτροπολυμερισμό, ανάγονται οι δισουλφιδικοί δεσμοί και οι θειόλες του απταμερούς σχηματίζουν ομοιοπολικούς δεσμούς με την επιφάνεια του χρυσού.



Εικόνα 60: Στάδια ακινητοποίησης απταμερών σε επιφάνεια χρυσού με σχηματισμό ομοιοπολικών δεσμών Α) χάρις στο TCEP και Β) με ηλεκτροπολυμερισμό.

Στη συνέχεια, για τη βελτίωση της τεχνικής με την πρόσθεση του TCEP στο μίγμα του απταμερούς και η παραμονή τους over night, δοκιμάστηκε η πρόσθεση ενός

υδρόφιλου πολυμερούς, του O-(2-Mercaptoethyl)-O'-methyl-hexa(ethylene glycol). Αυτό το μόριο σε σχέση με το απταμερές είναι πολύ μεγαλύτερο και εξυπηρετεί στην κάλυψη της ελεύθερης επιφάνειας χρυσού που δεν έχει ακινητοποιηθεί απταμερές. Επιπλέον, βοηθά στην αποφυγή συσσωματωμάτων απταμερούς στην επιφάνεια, βελτιώνοντας τη διασπορά του σε αυτή (Εικόνα 60). Έτσι, παρασκευάστηκε το μίγμα του απταμερούς με TCEP στο οποίο προστέθηκε 1,5 mM mPEG και εναποτέθηκε στην επιφάνεια, για 30'. Ξεπλύθηκε προσεκτικά με Binding Buffer για να χαρακτηριστεί.

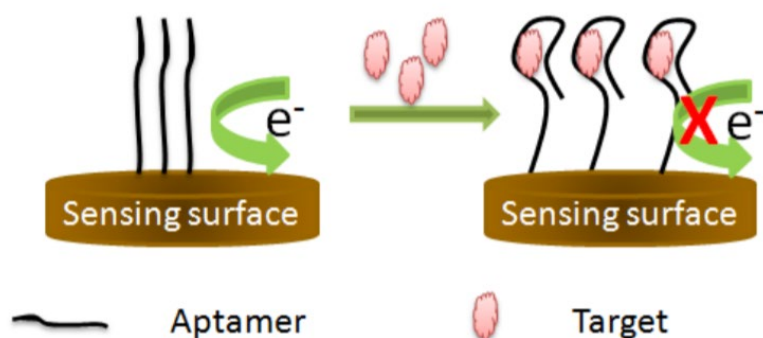


Γράφημα 82: Εμπέδηση ηλεκτροδίου χρυσού με 1μM απταμερές+200 μM TCEP+ 1,5 mM mPEG, πριν και μετά την προσθήκη 1μM DEHP. Ο χαρακτηρισμός έγινε σε 5 mM $K_3Fe(CN)_6 - K_4Fe(CN)_6$ σε Phosphate Buffer

Από το Γράφημα 82, φαίνεται η συνολική αύξηση της εμπέδησης της επιφάνειας πριν και μετά τον αναλύτη, αλλά και η αλλαγή της συμπεριφοράς των διαγραμμάτων σε αντίθεση με τις προηγούμενες τεχνικές. Πλέον είναι ξεκάθαρος ο σχηματισμός δύο διαφορετικών ημικυκλίων, όπως και η παρεμπόδιση της διέλευσης φορτίων προς την επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Με την εισαγωγή του mPEG, σχηματίζονται κατά κάποιον τρόπο δύο στρώματα, το εσωτερικό και το εξωτερικό. Με την ομοιοπολική πρόσδεση του αναλύτη προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα. Αρχικά, δεν επηρεάζεται ιδιαίτερα η εμπέδηση της επιφάνειας από τη μεταφορά ηλεκτρονίων.

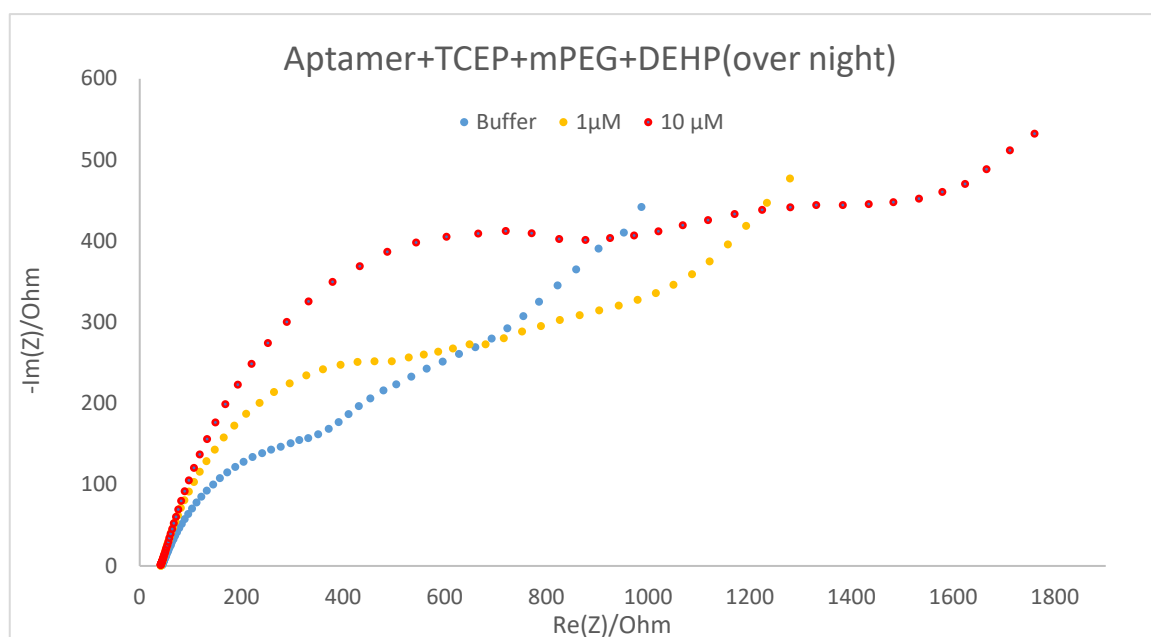
Επιπλέον, η αύξηση του δεύτερου ημικυκλίου οφείλεται στην αναδίπλωση μεγάλης ποσότητας απταμερών λόγω πρόσδεσής τους με τον αναλύτη, παρά το γεγονός ότι είναι

μικρό μόριο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της διέλευσης του οξειδωαναγωγικού ζεύγους από την επιφάνεια (Εικόνα 61). Αυτός ο αποκλεισμός επιφέρει μείωση στη μεταφορά των ηλεκτρονίων, η οποία μεταφράζεται σε υψηλότερη αντίσταση πόλωσης του εξωτερικού στρώματος.



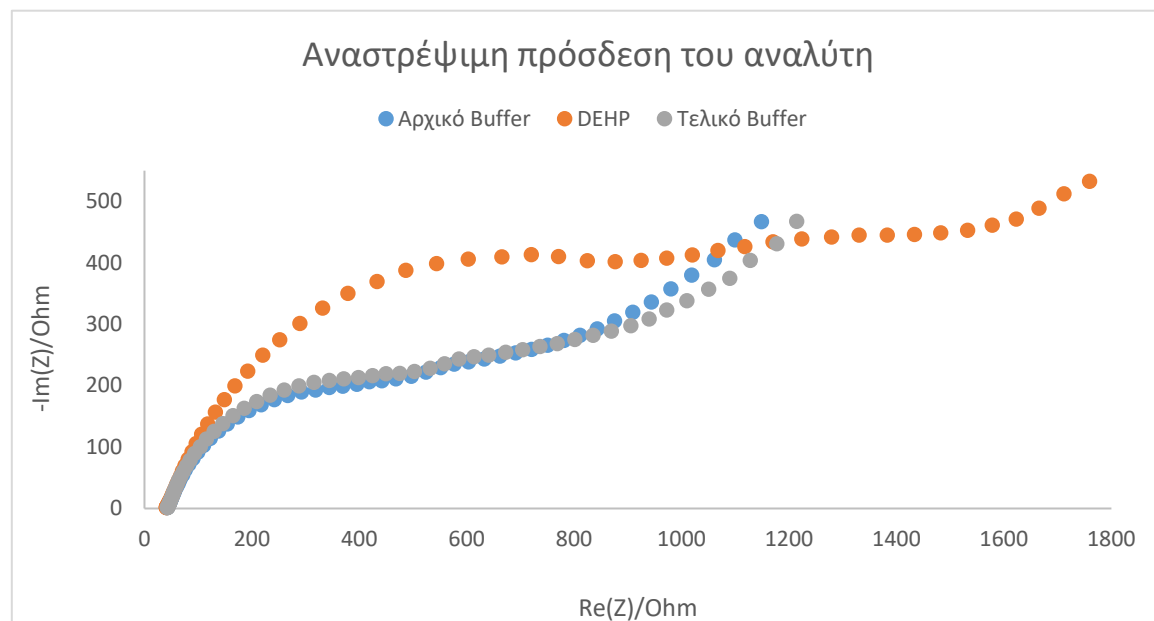
Εικόνα 61: Σχηματική απεικόνιση της αρχής της παρεμπόδισης μεταφοράς φορτίου που προκαλείται από την πρόσδεση του απταμερούς με τον αναλύτη (86)

Με αυτήν την τεχνική, εναποθέτοντας δηλαδή 1 μM απταμερές, 200 μM TCEP και 1,5 mM mPEG στην επιφάνεια χρυσού over night, εξετάστηκε η επίδραση δύο διαφορετικών συγκεντρώσεων DEHP. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν 1 και 10 μM DEHP σε 1% ACN.



Γράφημα 83: Καμπύλη βαθμονόμησης για 1 και 10 μM DEHP, με ακινητοποιημένο στην επιφάνεια 1 μM απταμερές+200 μM TCEP+ 1,5 mM mPEG. Ο χαρακτηρισμός έγινε σε 5 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ - $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ σε Phosphate Buffer

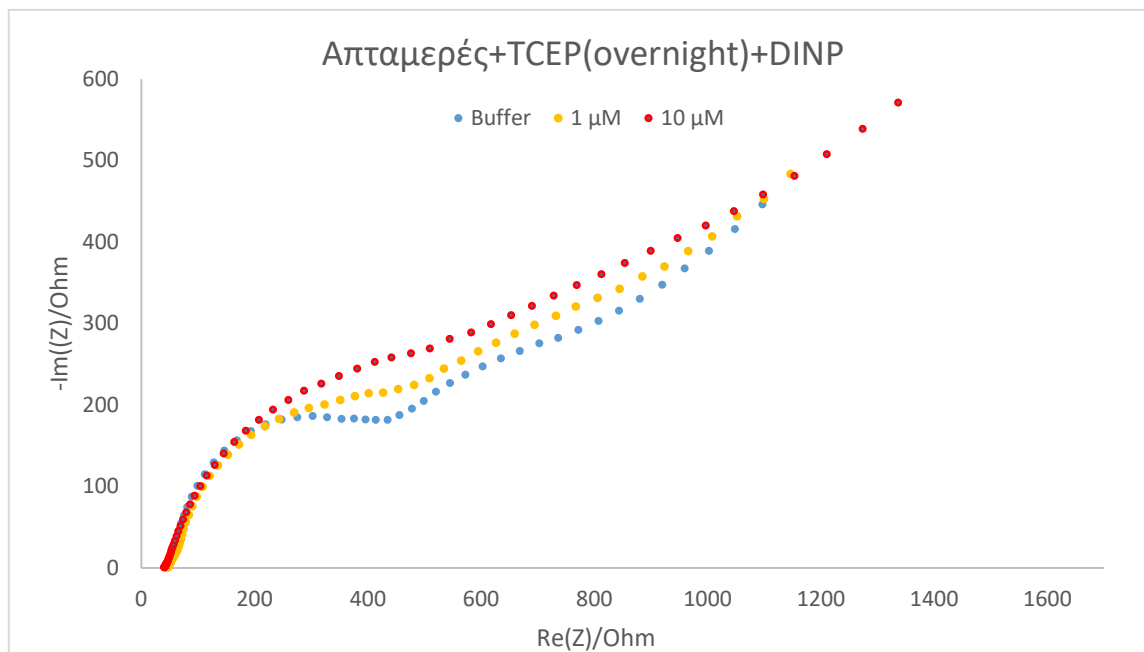
Σύμφωνα με το Γράφημα 83, με την εισαγωγή του DEHP παρουσιάζεται αύξηση της εμπέδησης της επιφάνειας, η οποία υποδηλώνει πως η πρόσδεση του αναλύτη με το απταμερές προκαλεί τέτοια αναδίπλωση του τελευταίου στο χώρο ώστε να παρεμποδίζεται η διέλευση φορτίων προς την επιφάνεια. Μάλιστα, με την αύξηση της συγκέντρωσης του DEHP, το φαινόμενο αυτό ενισχύεται προκαλώντας ακόμη μεγαλύτερη αύξηση της αντίστασης της επιφάνειας.



Γράφημα 84: Εμπέδηση ηλεκτροδίου χρυσού με 1μM απταμερές+200 μM TCEP+ 1,5 mM mPEG, χαρακτηρισμένο πριν και μετά την προσθήκη 10μM DEHP. Ο χαρακτηρισμός έγινε σε 5 mM $K_3Fe(CN)_6 - K_4Fe(CN)_6$ σε Phosphate Buffer

Έπειτα από την καμπύλη βαθμονόμησης του αισθητήρα για το DEHP, ελέγχθηκε η επίδραση του ξεπλύματος της επιφάνειας με Binding Buffer μετά την ανίχνευση του αναλύτη. Πιο συγκεκριμένα, η καθαρή επιφάνεια χρυσού τροποποιήθηκε με ακινητοποιημένο απταμερές, TCEP και mPEG και χαρακτηρίστηκε με 5 mM $K_3Fe(CN)_6 - K_4Fe(CN)_6$ σε Phosphate Buffer πριν και μετά την επώασή της για 30' με 10 μM DEHP σε 1% ACN. Στο Γράφημα 84, απεικονίζονται τα διαγράμματα εμπέδησης που προέκυψαν από το χαρακτηρισμό της επιφάνειας σε κάθε στάδιο. Φαίνεται πως η πρόσδεση του DEHP στη δομή του απταμερούς είναι αναστρέψιμη, καθώς το διάγραμμα του Buffer επανήλθε στο ίδιο σημείο και συμπεριφορά με την αρχική μέτρηση.

Τέλος, με το ίδιο απταμερές και με την ίδια μέθοδο τροποποίησης της επιφάνειας δοκιμάστηκε η ανίχνευση ενός άλλου πλαστικοποιητή, του DINP στις ίδιες συγκεντρώσεις δηλαδή 1 και 10 μM .

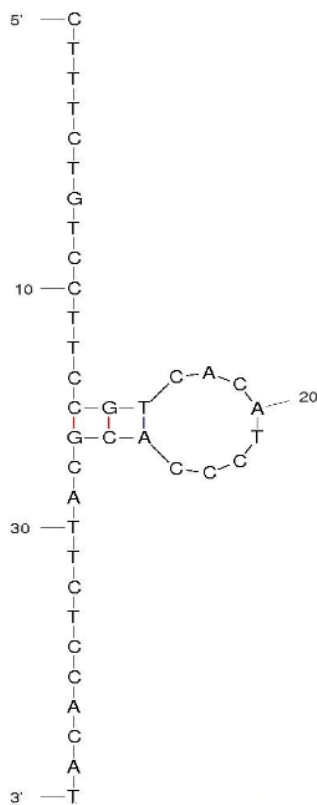


Γράφημα 85: Καμπύλη βαθμονόμησης για 1 και 10 μM DEHP, με ακινητοποιημένο στην επιφάνεια 1 μM απταμερές+200 μM TCEP+ 1,5 mM mPEG. Ο χαρακτηρισμός έγινε σε 5 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ - $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ σε Phosphate Buffer

Σε αυτό το γράφημα παρατηρείται διαφορετική συμπεριφορά στην εμπέδηση της επιφάνειας από αυτή στο Γράφημα 83, παρόλο που διατηρείται η τάση αύξησης της εμπέδησης με την αύξηση της συγκέντρωσης του αναλύτη. Σε αυτή την περίπτωση, ο σχηματισμός του δεύτερου ημικυκλίου δεν είναι ξεκάθαρος, καθώς η απόκριση της καμπύλης τείνει να γίνει γραμμική σε όλες τις συγκεντρώσεις. Ενδεχομένως αυτή η συμπεριφορά να οφείλεται στην διαφορετική αναδίπλωση του απταμερούς στο χώρο μετά την πρόσδεσή του με το DINP.

Καταλήγοντας, παρόλο που αυτό το απταμερές έχει επιλεγεί για την ανίχνευση του DEHP (7), διαπιστώθηκε ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί πιθανώς και για την ανίχνευση του DINP στην ίδια συγκέντρωση, χάρη στον κοινό δακτύλιο που παρουσιάζει η δομή τους. Το DINP είναι λίγο μεγαλύτερο μόριο από το DEHP, επομένως, με την πρόσδεση του με

τις αζωτούχες βάσεις της κυκλικής δομής που κατέχει το απταμερές (Εικόνα 62), προκαλεί το σχηματισμό διαφορετικού στρώματος στη διεπιφάνεια σε σχέση με το DEHP.



Εικόνα 62: Δομή του απταμερούς που προσδενεται με το DEHP

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στο παρόν κεφάλαιο συνοψίζονται τα συμπεράσματα που προέκυψαν πειραματικά κατά τη βελτιστοποίηση των πρωτοκόλλων κατασκευής ηλεκτροχημικών αισθητήρων για την ανίχνευση φυτοφαρμάκων και πλαστικοποιητών. Όσον αφορά τα πρώτα και για τον έλεγχο της δραστικότητας της ακετυλοχολινεστεράσης, αναδείχθηκε η αξία της χρωματομετρίας, ως μια τεχνική που μπορεί να παρέχει μια πληθώρα πληροφοριών σχετικών με το ένζυμο όπως η ταχύτητα κατάλυσης του υποστρώματος συναρτήσει των συγκεντρώσεων τόσο του ενζύμου όσο και του υποστρώματος. Κυρίως όμως, επιτρέπει το χαρακτηρισμό της παρεμπόδισης του ενζύμου παρουσία ενός φυτοφαρμάκου ενώ το ένζυμο βρίσκεται στη φυσική του κατάσταση σε διάλυμα. Ίσως αυτό είναι και το μεγάλο πλεονέκτημα της μεθόδου αυτής, καθώς κατά την κατασκευή ενός αισθητήρα απαιτείται η ακινητοποίηση του ενζύμου, η οποία συνεπάγεται μια έστω και μικρή μερική αποδιάταξη αυτού. Βέβαια, δεν είναι τόσο ευαίσθητη ως τεχνική για την ποσοτικοποίηση της αναστολής του ενζύμου από οργανοφωσφορικές και καρβαμικές ενώσεις και ειδικά όταν οι τελευταίες βρίσκονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις.

Όσον αφορά στη χρήση της ηλεκτροχημείας, η αρχική μελέτη που πραγματοποιήθηκε ως προς την ανίχνευση της θειοχολίνης, εφαρμόστηκε σε μη τροποποιημένα εμπορικά διαθέσιμα ηλεκτρόδια, έτσι ώστε να διασφαλίζονται οι όσο το δυνατόν πιο επαναλήψιμες μετρήσεις. Η μελέτη αυτή κατέδειξε ότι παρά το γεγονός ότι τα ηλεκτρόδια χρυσού είναι σαφώς πιο αγώγιμα από τα ηλεκτρόδια άνθρακα, το δυναμικό που απαιτείται για την οξείδωση της παραχθείσας θειοχολίνης είναι σχετικά υψηλό. Στα μεν δεύτερα λοιπόν το ρεύμα που παράγεται κατά της οξείδωσης της θειοχολίνης είναι πολύ ασθενές για να επιτρέψει την ανίχνευσή της ενώ στα ηλεκτρόδια χρυσού η χρήση υψηλού δυναμικού οδηγεί στην οξείδωση και άλλων μορίων στο ρυθμιστικό διάλυμα η οποία και υπερκαλύπτει το ρεύμα το οποίο παράγεται και κατά συνέπεια καθιστά αδύνατη την ανίχνευσή της. Για τον λόγο αυτό κρίνεται απαραίτητη η τροποποίηση των ηλεκτροδίων τόσο για την αύξηση της αγωγιμότητας όσο και για την μείωση του δυναμικού που απαιτείται για την οξείδωση της θειοχολίνης. Τα πρωτόκολλα που αναπτύχθηκαν και δοκιμάστηκαν κρίθηκαν τόσο ως προς την δυνατότητα επίτευξης υψηλού σήματος κατά την οξείδωση της θειοχολίνης σε όσο το δυνατόν μικρότερο εφαρμοζόμενο δυναμικό όσο και ως προς την επαναληψιμότητα των μετρήσεων καθώς οποιοδήποτε στάδιο

τροποποίησης ενός ηλεκτροδίου εκ των πραγμάτων εισάγει ακόμη έναν παράγοντα που οδηγεί στην μη επαναληψιμότητα των μετρήσεων και στην μείωση της αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων.

Παρά την εφαρμογή αρκετών πρωτοκόλλων για την τροποποίηση των ηλεκτροδίων χρυσού, δεν επιτεύχθηκε ο ιδανικός σχεδιασμός του αισθητήρα με τέτοιο τρόπο ώστε να διασφαλίζεται ταυτόχρονα η αυξημένη αγωγιμότητα της επιφάνειας με την κατάλληλη ακινητοποίηση του ενζύμου σε αυτή. Γι' αυτό το λόγο διερευνήθηκε εκτενώς ο σχεδιασμός του βιοαισθητήρα με βάση τα ηλεκτρόδια άνθρακα. Τα ηλεκτρόδια αυτά είναι μεν λιγότερο αγωγίμα από αυτά του χρυσού, αλλά είναι πολύ πιο κατάλληλα για να τροποποιηθούν με νανοϋλικά όπως το Prussian Blue, το Cobalt-Corphthalocyanine και το Carbon Black σε χιτοζάνη.

Το Carbon Black αναδείχθηκε ως το πιο κατάλληλο υλικό για την επίτευξη του στόχου της ανίχνευσης της οξείδωσης της θειοχολίνης καθώς οδηγεί στην αύξηση τόσο της αγωγιμότητας της επιφάνειας όσο και τη τραχύτητάς της προσφέροντας ένα σταθερό υπόστρωμα για την ακινητοποίηση του ενζύμου. Πέραν τούτου η χρήση ενός πλέγματος ηλεκτρικά αγωγίμου Nafion σε συνδυασμό με την χρήση αλβουμίνης βελτίωσε περαιτέρω την ακινητοποίηση του ενζύμου επιτυγχάνοντας την μικρότερη δυνατή μετουσίωσή του. Αυτό διαπιστώθηκε και πειραματικά μέσω του γεγονότος ότι τόσο το ελεύθερο ένζυμο σε διάλυμα όσο και το ακινητοποιημένο στην επιφάνεια παρουσιάζουν παρόμοια συμπεριφορά ως προς την καμπύλη κορεσμού με υπόστρωμα, καθώς και για τα δύο ο κορεσμός αυτός και η μέγιστη δυνατή απόκριση επιτυγχάνεται με συγκέντρωση υποστρώματος μεταξύ 1 και 2,5mM. . Πέραν τούτων η εκτενής διερεύνηση της επίδρασης τόσο της παρουσίας ακετονιτριλίου (καθώς είναι ο οργανικός διαλύτης στον οποίο διαλυτοποιούνται τα φυτοφαρμάκα) όσο και του ρυθμιστικού διαλύματος κατέδειξε την σημασία επίτευξης ενός σταθερού σήματος πριν την οποιαδήποτε μέτρηση παρεμπόδισης του ενζύμου παρουσία ενός φυτοφαρμάκου. Από τα πειράματα που διεξήχθησαν διαπιστώθηκε ότι το πλέγμα χιτοζάνης κατά την έκθεση του σε ρυθμιστικό διάλυμα ενυδατώνεται ενώ η παρουσία αλάτων επιδρά στην αγωγιμότητα του και γι αυτό τον λόγο βελτιστοποιήθηκαν οι συνθήκες που απαιτούνται για την σταθεροποίησή του. Όσον αφορά τον οργανικό διαλύτη κρίθηκε ότι σε συγκεντρώσεις ανάλογες με εκείνες στις οποίες θα βρίσκεται στα πραγματικά δείγματα προς εξέταση επιδρά στο πλέγμα και γι αυτό αποφασίστηκε ότι η καλύτερη λύση είναι να συμπεριληφθεί στο ρυθμιστικό διάλυμα κατά

την λήψη ενός baseline. Μετέπειτα και για πρώτη φορά πραγματοποιήθηκε μελέτη ως προς την διαφορά που έχουν δύο διαφορετικά άλατα του υποστρώματος της ακετυλοχολινεστεράσης και διαπιστώθηκε ότι παρότι το ρεύμα το οποίο παράγεται κατά την οξειδωση του παρεχθέντος προϊόντος είναι παρόμοιο, ο χρόνος που απαιτείται για την επίτευξη του μέγιστου σήματος διαφέρει και κατά πάσα πιθανότητα έχει να κάνει με την διαλυτότητα του άλατος. Αυτό έχει πολύ σημαντικές συνέπειες τόσο στον χρόνο που απαιτείται για κάθε μέτρηση όσο και στο δυναμικό που απαιτείται για την ανίχνευση της οξειδωσης της θειοχολίνης, ανάλογα με την τροποποίηση που φέρει η επιφάνεια.

Τέλος, όσον αφορά στην ανίχνευση των φυτοφαρμάκων διερευνήθηκε η σχέση της παρεμπόδισης του ενζύμου ανάλογα με την συγκέντρωση του ακινητοποιημένου ενζύμου και η επιλέχθηκε η καταλληλότερη έστι ώστε αφενός να επιτυγχάνεται ένα ικανό προς ανίχνευση παραγόμενο ρεύμα αλλά ταυτόχρονα να καθίσταται δυνατή η ανίχνευση ακόμη και μικρών συγκεντρώσεων του αναλύτη. Ταυτόχρονα, όπως φάνηκε και με την χρήση της χρωματογραφίας κάθε φυτοφάρμακο επηρεάζει διαφορετικά το ένζυμο και αυτό συνεπάγεται διαφορετικά ποσοστά παρεμπόδισης για την ίδια συγκέντρωση φυτοφαρμάκου. Εξίσου σημαντικός είναι και ο μηχανισμός παρεμπόδισης του ενζύμου (αναστρέψιμος ή μη κ.ο.κ) στο πώς θα πραγματοποιηθεί η μέτρηση καθώς τα ποσοστά παρεμπόδισης που επιτυγχάνονται διαφέρουν σημαντικά όχι μόνο ως προς την ικανότητα ενός φυτοφαρμάκου να παρεμποδίσει ένα έναζυμο αλλά και ως προς τον χρόνο παρεμπόδισης και την διαδικασία που θα ακολουθηθεί κατά την μέτρηση. Η αυξημένη αγωγιμότητα της επιφάνειας χάρη στο Carbon Black, όπως και Η κατάλληλη ακινητοποίηση του ενζύμου επέτρεψε την ανίχνευση χαμηλών συγκεντρώσεων του carbofuran ενώ αντίθετα η αναστολή του ενζύμου από το chlorpyrifos και το phosmet, όπως και στη χρωματομετρία, απαιτούσε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις των αναλυτών.

Όσον αφορά το βιοαισθητήρα βασισμένο σε απταμερή για την ανίχνευση των φθαλικών εστέρων (πλαστικοποιητών), οι προκαταρκτικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν κατέδειξαν την σημασία του τρόπου ακινητοποίησης του απταμερούς στην επιφάνεια ως τον πλέον καθοριστικό παράγοντα για την επίτευξη αυτού του στόχου. Καθώς η αναγνώριση του αναλύτη με την χρήση απταμερών βασίζεται στην χωροταξική διαμόρφωση των τελευταίων, ο τρόπος που αυτά εναποτίθενται στην επιφάνεια όπως και η ελευθερία να μεταβάλουν την δομή τους δρουν καταλυτικά στην ικανότητά τους να δημιουργούν ένα σύμπλοκο με τον μόριο στόχο. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων που

πραγματοποιήθηκαν έδειξαν ότι η χρήση μορίων όπως η πολυεθυλενογλυκόλη (PEG) απομακρύνουν τα μη ομοιοπολικά προσδεδεμένα απταμέρη από την επιφάνεια και δημιουργούν μια επίστρωση ενδιάμεσα από τα απταμερή που επιτρέπει στα τελευταία να αναγνωρίσουν τόσο το DEHP, έναν πλαστικοποιητή για τον οποίο και επιλέχθηκαν αλλά και το DINP, έναν φθαλικό εστέρα ο οποίος παρότι φέρει τον ίδιο δακτύλιο με το DEHP δεν χρησιμοποιήθηκε στην επιλογή του απταμερούς. Κατά την εξέταση των επιφανειών με την τεχνική της εμπέδησης παρουσία ενός οξειδωαναγωγικού ζεύγος, τα διαγράμματα που προκύπτουν, υποδηλώνουν πώς η παρουσία του αναλύτη μεταβάλλει τη διάταξη του απταμερούς στο χώρο, με τέτοιο τρόπο ώστε τα ηλεκτρικά φορτία δεν μπορούν να διαπεράσουν το στρώμα που έχει παραχθεί και να φτάσουν στην επιφάνεια. Παράλληλα, εμφανίζονται δύο ημικύκλια στη μορφή των διαγραμμάτων που υποδηλώνουν την ύπαρξη δύο διαφορετικών διεπιφανειών παρουσία του αναλύτη. Αυτό είναι είναι αρκετά σύνηθες φαινόμενο που υποδηλώνει την μεταβολή της δομής του απταμερούς από την μία (διεπιφάνεια διαλύματος-απταμερούς) και την μεταβολή της αντίστασης της επιφάνειας (διεπιφάνεια ηλεκτροδίου-αυτοδιατασσόμενης μονοστοιβάδας). Το γεγονός ότι δεν πρόκειται για δύο τέλεια ημικύκλια μπορεί να αποδοθεί στις στην μη ομοιογενή τραχύτητα της επιφάνειας που συνεπάγεται στην δημιουργία μιας μη τέλεια σχηματισμένης μονοστοιβάδας απταμερούς και πολυεθυλενογλυκόλης (86).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10: ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ

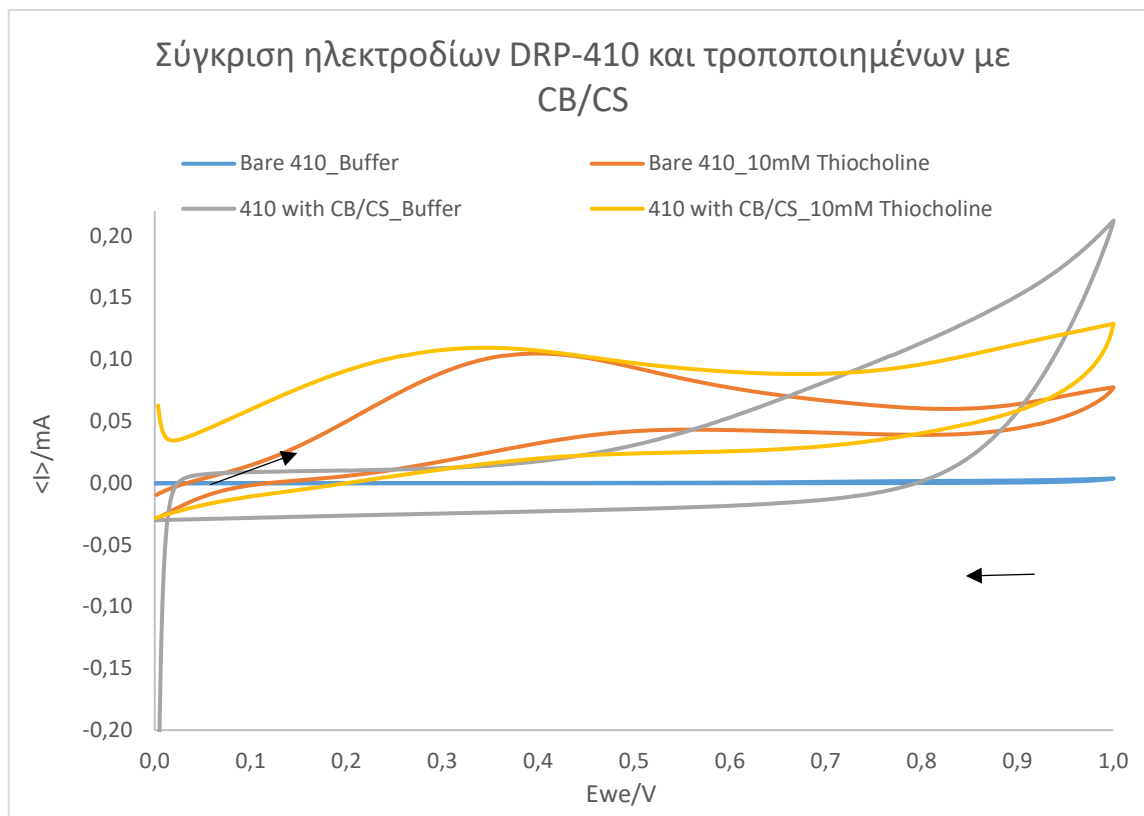
10.1 Τεχνικές βελτίωσης της ευαισθησίας του ενζυμικού βιοαισθητήρα

10.1.1 Τροποποίηση ηλεκτροδίων με τη χρήση νανοϋλικών ή συνδυασμό αυτών

Από την παρούσα εργασία προέκυψε ότι παρότι για το μεν carbofuran το όριο ανίχνευσης που επιτεύχθηκε είναι αρκετά χαμηλότερο του επιτρεπτού ορίου του συγκεκριμένου φυτοφαρμάκου στα τρόφιμα για τις άλλες δύο ενώσεις (phosmet, και chloryrifos) το όριο ανίχνευσης ήταν αρκετές τάξεις μεγέθους μεγαλύτερο από το επιθυμητό (mM αντί για μM). Αυτό μπορεί φυσικά να αποδοθεί στην ίδια την ικανότητα αναστολής του ενζύμου που μπορεί να επιτευχθεί παρουσία του κάθε αναλύτη και η οποία αφενός διαφέρει σημαντικά αφετέρου είναι μια εγγενής ιδιότητα του ζεύγους ενζύμου-φυτοφαρμάκου που εξετάζεται κάθε φορά.

Παρόλα αυτά, στη βιβλιογραφία ένα πολύ μικρότερο όριο ανίχνευσης μπορεί να επιτευχθεί και για τα δύο με την χρήση των κατάλληλων τροποποιήσεων της επιφάνειας. Για παράδειγμα το chloryrifos έχει ανιχνευθεί και σε πολύ χαμηλότερες συγκεντρώσεις, της τάξης των μM , με διάφορες τροποποιήσεις της επιφάνειας όπως νανοσωλήνες άνθρακα μέσα σε χιτοζάνη, νανοσωματίδια μαγνητήτη σε πλέγμα γραφενίου, νανοσωματίδια χρυσού ή ssDNA μαζί με νανοσωλήνες άνθρακα. (90)-(93) Αντίστοιχα, το phosmet έχει ανιχνευθεί στην κλίμακα των nM με τη βοήθεια νανοσύνθετου κράματος Fe-Ni σε μήτρα πολυβινυλικής αλκοόλης.(94). Αυτό σημαίνει ότι μελλοντικά μπορεί να εξεταστούν και άλλες τροποποιήσεις της επιφάνεια για την επίτευξη ενός χαμηλότερου ορίου ανίχνευσης.

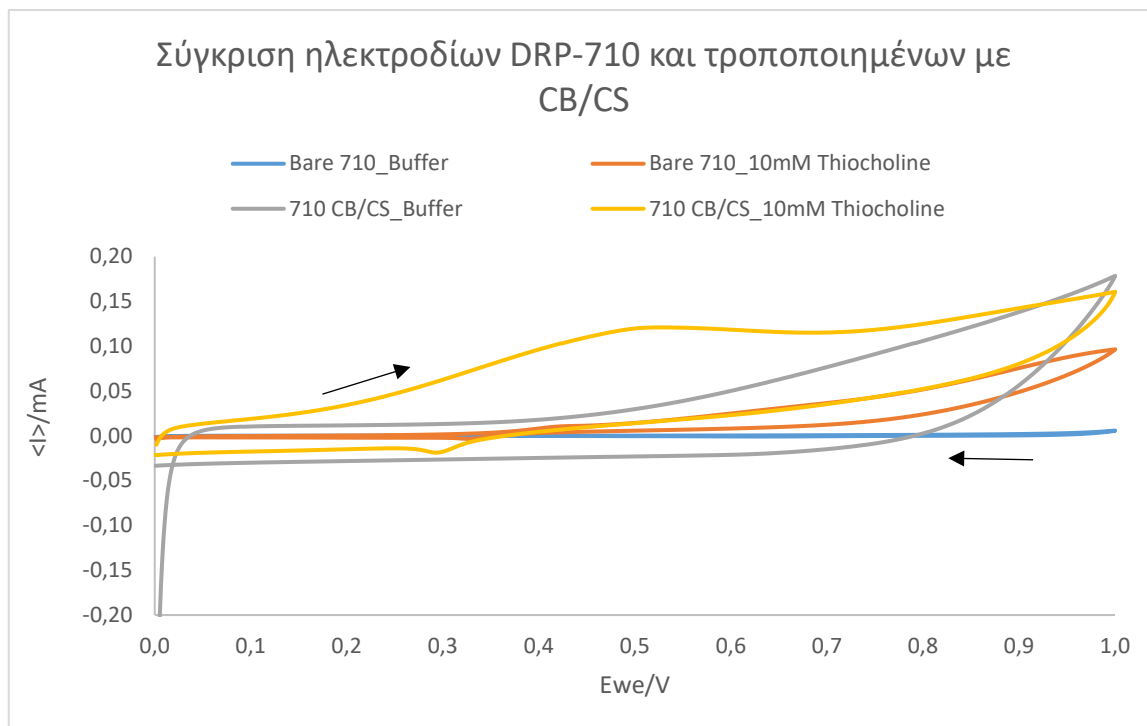
Στα πλαίσια αυτά πραγματοποιήθηκε ήδη μια πρωταρχική μελέτη για το συνδυασμό των εμπορικά διαθέσιμων ηλεκτροδίων άνθρακα τροποποιημένων με Cobalt-Phthalocyanine και Prussian Blue (DRP 410 και DRP 710) με το βελτιστοποιημένο πρωτόκολλο αύξησης της αγωγιμότητας με νανοσωματίδια Carbon Black διεσπαρμένα σε χιτοζάνη.



Γράφημα 86: Σύγκριση μεταξύ των σκέτων ηλεκτροδίων DRP-410 και τροποποιημένων με CB/CS, με Phosphate Buffer 50 mM + 0,1M KCl και με 10mM ενζυμικά παραγόμενη θειοχολίνη. Scan rate 50mV/s

Όπως φαίνεται στο παραπάνω διάγραμμα με την τροποποίηση των ηλεκτροδίων Co-Pthalocyanine με 2 σταγόνες των 3 μL Carbon Black, παρουσιάζεται μια πολύ μεγάλη αύξηση του σήματος του Buffer έναντι του σκέτου ηλεκτροδίου, λόγω της αύξησης της αγωγιμότητας της επιφάνειας. Παρόλα αυτά στην ανίχνευση της ενζυμικά παραγόμενης θειοχολίνης στα 10 mM, η μεταβολή του διαγράμματος είναι ελάχιστη καθώς το διάγραμμα πριν και μετά την τροποποίηση είναι παρόμοια.

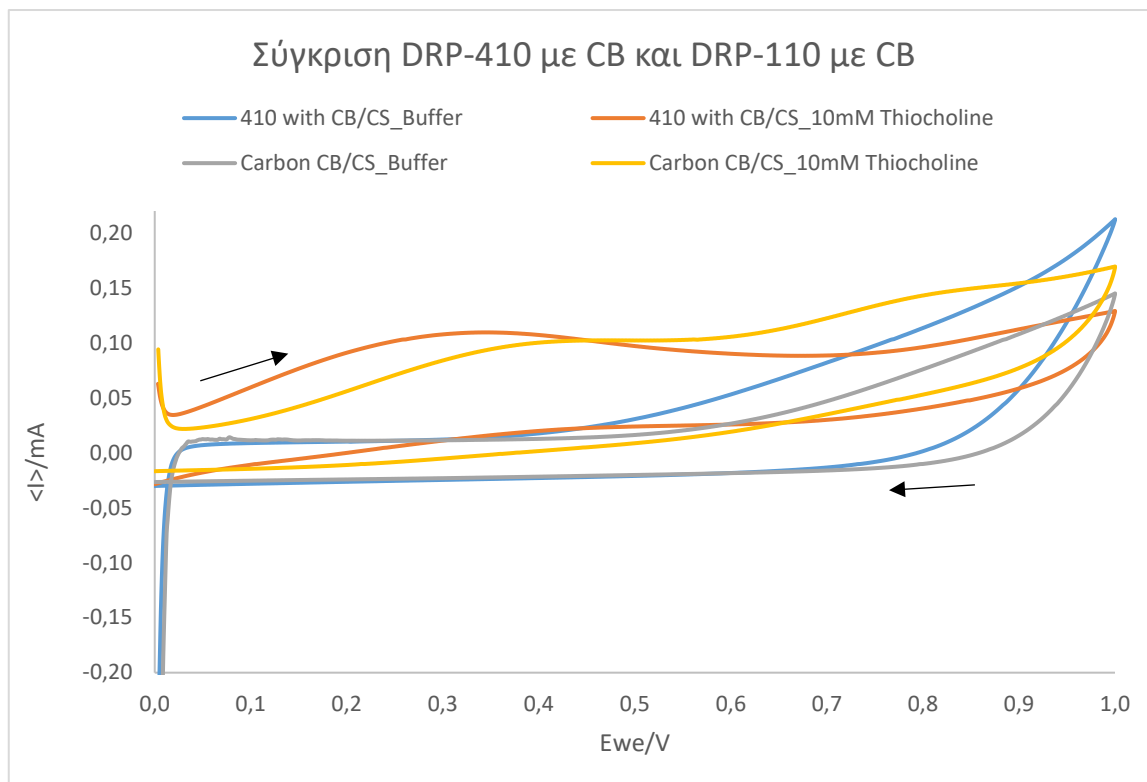
Παρά την αύξηση της αγωγιμότητας λοιπόν η συγκεκριμένη τροποποίηση δεν βελτιώνει το σήμα που λαμβάνεται κατά την οξείδωση της θειοχολίνης στην επιφάνεια. Το γεγονός ότι η οξειδωαναγωγική κορυφή της ανίχνευσης της θειοχολίνης σχηματίζεται για το τροποποιημένο ηλεκτρόδιο κοντά στα 0,3 V, ενώ για το ατροποποίητο στα 0,4 V. οφείλεται στην τροποποίηση με CB καθώς δίνεται η δυνατότητα ανίχνευσης σε χαμηλότερο εφαρμοζόμενο δυναμικό σε σχέση με το ατροποποίητο ηλεκτρόδιο. Η ίδια διαδικασία με το CB επαναλήφθηκε και για το ηλεκτρόδιο άνθρακα DRP-710.



Γράφημα 87: Σύγκριση μεταξύ των σκέτων ηλεκτροδίων DRP-710 και τροποποιημένων με CB/CS, με Phosphate Buffer 50 mM + 0,1M KCl και με 10mM ενζυμικά παραγόμενη θειοχολίνη. Scan rate 50mV/s

Σε αντίθεση με το Γράφημα 86, στο Γράφημα 87 φαίνεται πως με την εναπόθεση των σταγόνων CB πάνω στην επιφάνεια άνθρακα με Prussian Blue, χάνονται οι ιδιότητες και οι κορυφές που παίρνονται με ηλεκτρόδια τροποποιημένα με Prussian Blue και επικρατεί η συμπεριφορά που προσδίδεται στο CB. Όπως και για το προηγούμενο ηλεκτρόδιο (DRP-410) η αγωγιμότητα του ατροποποίητου ηλεκτροδίου φαίνεται πολύ χαμηλότερη σε σχέση με το σήμα που λαμβάνεται μετά την τροποποίηση. Επίσης, η ανίχνευση της θειοχολίνης στο τροποποιημένο ηλεκτρόδιο επιτυγχάνεται στα 0,5 V έναντι των 0,6 V περίπου στο ατροποποίητο ηλεκτρόδιο (γράφημα στην αντίστοιχη ενότητα).

Λόγω του ότι η τροποποίηση μιας επιφάνειας με CB δίνει την δυνατότητα, πέραν της αύξησης της αγωγιμότητας του ηλεκτροδίου, να ακινητοποιηθεί πολύ καλύτερα το ένζυμο στο πλέγμα Nafion συγκρίθηκαν το DRP-410 με το DRP-110, και τα δύο τροποποιημένα με βάση το ίδιο πρωτόκολλο εναπόθεσης CB σε χιτοζάνη.



Γράφημα 88: Σύγκριση μεταξύ των τροποποιημένων ηλεκτροδίων DRP-410 και DRP-110 με CB/CS, με Phosphate Buffer 50 mM + 0,1M KCl και με 10mM ενζυμικά παραγόμενη θειοχολίνη. Scan rate 50mV/s

Παρατηρείται πως στο Γράφημα 88, οι τροποποιήσεις στα δύο ηλεκτρόδια επιφέρουν κοινά χαρακτηριστικά στις επιφάνειες. Παρόλα αυτά στο ηλεκτρόδιο με Co-Phthalocyanine η ανίχνευση της οξείδωσης της θειοχολίνης μπορεί όχι μόνο να πραγματοποιηθεί σε λίγο μικρότερο δυναμικό (διαφορά 0,1 V μεταξύ τους) συγκριτικά με τον σκέτο άνθρακα και CB, αλλά και με ελάχιστα αυξημένο σήμα (109 μA έναντι των 100 μA του άνθρακα). Θα είχε λοιπόν ενδιαφέρον η ακινητοποίηση του ενζύμου σε αυτή την επιφάνεια με στόχο τη μελέτη της δράσης του σε αυτές τις νέες συνθήκες.

Πέραν των τροποποιήσεων των επιφανειών με ένα ή συνδυασμούς διαφορετικών νανοϋλικών μπορούν να χρησιμοποιηθούν κι άλλες ηλεκτροχημικές μέθοδοι χαρακτηρισμού των επιφανειών, όπως η διαφορική παλμική βολταμετρία ή η βολταμετρία τετραγωνικού παλμού, καθώς και οι δύο αυτές τεχνικές παρουσιάζουν μεγάλη ευαισθησία.

10.1.2 Χρήση γενετικά τροποποιημένης AChE

Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη στρατηγική για την επίτευξη πιο ευαίσθητων και επιλεκτικών ενζύμων και κατά συνέπεια βιοαισθητήρων, είναι η αύξηση της χημικής συγγένειας για τον αναλύτη-στόχο ευνοώντας την προσβασιμότητα της ενεργού θέσης. Έτσι, η γενετική τροποποίηση συγκεκριμένων αμινοξέων έχει χρησιμοποιηθεί για την τελειοποίηση των χαρακτηριστικών της AChE προκειμένου να αυξηθεί περαιτέρω η σταθερότητα, η επιλεκτικότητα και η ευαισθησία με στόχο την παραγωγή βελτιστοποιημένων ενζύμων που με τη σειρά τους θα ήταν κατάλληλα για την ανάπτυξη νέων βιοαισθητήρων.

Έχει αναφερθεί ότι ο συνδυασμός τροποποιημένων AChEs με διαφορετικά επίπεδα ευαισθησίας για διαφορετικούς αναλύτες επιτρέπει τη δημιουργία επιλεκτικών βιοαισθητήρων και ότι τα ένζυμα που εξάγονται από διαφορετικές πηγές έχουν διαφορετικές ευαισθησίες και επιλεκτικότητα προς τα παρασιτοκτόνα. Για παράδειγμα, η AChE που εξάγεται από το *Drosophila melanogaster* (dm) μπορεί να είναι έως και 8 φορές πιο ευαίσθητη από την AChE του ηλεκτροφόρου χελιού. Έτσι, έχουν δημοσιευθεί αρκετά έργα που στοχεύουν στην παραγωγή μεγάλης κλίμακας γενετικά τροποποιημένων AChE ενζύμων από το άγριο dm.

Έχουν διερευνηθεί οι επιδόσεις της γενετικώς τροποποιημένης AChE από το dm και από εμπορικές πηγές (ee, be, he) ως βιολογικοί υποδοχείς για την ανίχνευση του παρασιτοκτόνου του methamidophos με βάση μελέτες αναστολής και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η πιο επεξεργασμένη παραλλαγή της AChE από dm παρουσίασε αυξημένη ευαισθησία προς το methamidophos. Μεταξύ των 24 dmAChE παραλλαγών που εξετάστηκαν, 12 παρουσίασαν ευαισθησία συγκρίσιμη με την εμπορικά διαθέσιμη eeAChE, αλλά υψηλότερη από την AChEs από he και be. Ο αισθητήρας που κατασκευάστηκε με γενετικώς τροποποιημένα ένζυμα έδειξε καλύτερα χαρακτηριστικά σε σχέση με το όριο ανίχνευσης και την ευαισθησία σε σύγκριση με εκείνα που χρησιμοποιούν το εμπορικό eeAChE. Το χαμηλότερο όριο ανίχνευσης 1 ppb ελήφθη με τα μεταλλαγμένα D375G, Y370F, Y374A, F376L από το dmAChE, σε σύγκριση με τα 90 ppb από το εμπορικό eeAChE.

Σε ένα από αυτά τα έργα ακινητοποιήθηκε ανασυνδυασμένη dmAChE σε ηλεκτρόδια τροποποιημένα με παχύ υμένιο νικέλιου προκειμένου να βελτιωθούν τα όρια ανίχνευσης. Η εργασία αυτή ανέφερε τα όρια ανίχνευσης για το paraoxon, το dichlorvos και το chlorpyrifos ethyl-oxon να είναι 10^{-9} mol/L. Άλλη έρευνα, έδειξε τη χρήση των εκδόχων dmAChE, τα οποία εμφάνιζαν μεγάλη ευαισθησία στο methamidophos με ένα από τα επτά εξεταζόμενα τροποποιημένα AChE (Dros)-B03 μειώνοντας την ανιχνεύσιμη συγκέντρωση του methamidophos σε τιμή τόσο χαμηλή όσο 1,4 ppb (mg/L) έως 4,8 ppb που επιτεύχθηκε με το άγριου τύπου dmAChE και 53 ppb που επιτεύχθηκε με eeAChE.

Enzyme Source	Electrode material	Detection technique	Limit of Detection (mol L^{-1})	Analyte	Incubation time
dmAChE (E69Y Y71D)	AChE/Carbon pellet	Amperometry-FIA	$\sim 1 \times 10^{-17}$	Dichlorvos	10 min
eeAChE	AChE/Carbon pellet	Amperometry-FIA	1×10^{-8}	Dichlorvos	10 min
dmAChE (E69Y Y71D)	AChE/Carbon pellet	Amperometry-FIA	1×10^{-12}	Paraoxon	10 min
dmAChE	AChE/CoPC/SPE	Electrochemical-FIA	$\sim 1 \times 10^{-17}$	Dichlorvos	NR
dmAChE	AChE/CoPC/SPE	Electrochemical-FIA	$\sim 1 \times 10^{-16}$	Parathion	NR
dmAChE	AChE/CoPC/SPE	Electrochemical-FIA	$\sim 1 \times 10^{-16}$	Azinphos	NR
dmAChE	AChE/PVA-SbQ/SPE	Amperometry	7×10^{-11}	Dichlorvos	10 min
eeAChE	AChE/PVA-SbQ/SPE	Amperometry	6×10^{-7}	Dichlorvos	10 min

Πίνακας 11: Σύγκριση των γενετικά τροποποιημένων ενζύμων και τα αντίστοιχα όρια ανίχνευσης(45)

Η ανάπτυξη ενός αυτοματοποιημένου βιοαισθητήρα με βάση τη ροή που χρησιμοποιεί γενετικώς τροποποιημένα ένζυμα AChE B394, B4 και άγριου τύπου B131 αναφέρθηκε από τους Mishra et al. Ο βιοαισθητήρας βασίστηκε σε SPE που ενσωματώθηκε σε κυψελίδα ροής (flowcell). Τα ένζυμα ακινητοποιήθηκαν σε τροποποιημένα ηλεκτρόδια με κοβάλτιο (II) και φθαλοκυανίνη (CoPC) με παγίδευση σε ένα φωτο-διασταυρούμενο πολυμερές (PVAWP). Ο αυτοματοποιημένος βιοαισθητήρας με βάση τη ροή χρησιμοποιήθηκε με επιτυχία για τον ποσοτικό προσδιορισμό του chlorpyrifos-oxon (CPO), του ethyl paraoxon (EPOx) και του malaoxon (MOx). Ο συνολικός χρόνος ανάλυσης για τον προσδιορισμό ήταν μικρότερος από 15 λεπτά. Τα καλύτερα όρια ανίχνευσης λήφθηκαν με το B394. (49)

10.2 Τεχνικές βελτίωσης του αισθητήρα που βασίζεται σε απταμερή

Για την ανίχνευση φθαικών ενώσεων με ηλεκτροχημικούς αισθητήρες που βασίζονται στα απταμερή, η βιβλιογραφία είναι αρκετά περιορισμένη. Επίσης το γεγονός ότι είναι μικρά και υδρόφοβα μόρια, καθιστά την ανίχνευση τους ιδιαίτερα δύσκολη. Γι αυτό τον λόγο αξίζει να μελετηθεί εκτενέστερα η επίδραση της πρόσδεσής τους στη δομή του απταμερούς, όπως και στη συνολική διαμόρφωση της μονοστοιβάδας των απταμερών πάνω στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου.

Από ηλεκτροχημικής πλευράς, είναι απαραίτητη η μελέτη κι άλλων ευαίσθητων τεχνικών εκτός από την εμπέδηση, όπως η βολταμετρία τετραγωνικού παλμού (SWV) (88). Πέραν τούτου και με τη βοήθεια της σήμανσης των απταμερών με ηλεκτροενεργά μόρια χωρίς την απροσδόκητη αύξηση της πολυπλοκότητας του αισθητήρα, μπορεί να επιτευχθεί η καλύτερη κατανόηση του μηχανισμού πρόσδεσης απταμερούς-αναλύτη, που θα έχει ως αποτέλεσμα την απόδοση ενός ηλεκτρικού μετρήσιμου σήματος. (89)

Παράλληλα με τον ηλεκτροχημικό χαρακτηρισμό των απταμερών, κρίνεται απαραίτητη και η καλύτερη κατανόηση των μεταβολών που επέρχονται στην δομή τους παρουσία του αναλύτη. Για τον σκοπό αυτό θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί η Φασματοσκοπία Κυκλικού Διχρωισμού (CD), με βάση την οποία διερευνούνται με τη βοήθεια της πολωμένης ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας, τα εξής:

- Στοιχεία δευτεροταγούς δομής
- Αλλαγές στη διαμόρφωση των ολιγονουκλεοτιδίων, που δεν προβλέπονται με το λογισμικό του mFold και οφείλονται στο pH, στη θερμοκρασία κλπ
- Μηχανισμός αναδίπλωσης του μορίου (95)

Στην περίπτωση που από τις άνωθι μελέτες διαπιστωθεί ότι οι μεταβολές στο απταμερές είναι μικρές κατά την αναγνώριση ενώσεων της οικογένειας των φθαικών εστέρων τότε θα διερευνηθεί και η χρήση μιας συμπληρωματικής αλυσίδας σημασμένης με ένα ηλεκτροενεργό μόριο (Εικόνα 57) η οποία θα απομακρύνεται παρουσία του αναλύτη.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (1) M. Stoytcheva, Enzyme vs. bacterial electrochemical sensors for organophosphorus pesticides quantification, in: V.S. Somerset (Ed.), *Intelligent and Biosensors*, InTech, Croatia, 2010, pp. 217–230
- (2) A.Y. El-Moghazy, E.A. Soliman, H.Z. Ibrahim, T. Noguez, J.-L. Marty, G. Istamboulie, “Ultra-sensitive biosensor based on genetically engineered acetylcholinesterase immobilized in poly (vinyl alcohol)/Fe–Ni alloy nanocomposite for phosmet detection in olive oil, *Analytical Methods*, Food Chemistry 203 (2016) 73-78
- (3) World Health Organization (2010). *The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification 2009*. World Health Organization. Retrieved July 9, 2014
- (4) "40 C.F.R.: Appendix A to Part 355—The List of Extremely Hazardous Substances and Their Threshold Planning Quantities" (*July 1, 2008 ed.*). Government Printing Office. Retrieved October 29, 2011
- (5) Asif I. Zia, Subhas Chandra Mukhopadhyay, Pak-Lam Yu, I.H. Al-Bahadly, Chinthaka P. Gooneratne, Jürgen Kosel, Rapid and molecular selective electrochemical sensing of phthalates in aqueous solution, *Biosensors and Bioelectronics* 67 (2015) 342–349
- (6) Lorz, Peter M. Towae, Friedrich K. Enke, Walter Jäckh, Rudolf Bhargava, Naresh Hillesheim, Wolfgang (2007). "Phthalic Acid and Derivatives". doi:10.1002/14356007.a20_181.pub2
- (7) Yu Han et al., “Selection of Group-Specific Phthalic Acid Esters Binding DNA Aptamers via Rationally Designed Target Immobilization and Applications for Ultrasensitive and Highly Selective Detection of Phthalic Acid Esters”, *Analytical Chemistry*, 2017, 89, 5270–5277, DOI: 10.1021/acs.analchem.6b04808
- (8) Zia, A. I., Rahman, M. S. A., Mukhopadhyay, S. C., Yu, P.-L., Al-Bahadly, I. H., Gooneratne, C. P., Liao, T.-S. (2013). Technique for rapid detection of phthalates in water and beverages. *Journal of Food Engineering*, 116(2), 515–523. <http://dx.doi:10.1016/j.jfoodeng.2012.12.024>
- (9) A. Hierlemann “Integrated Chemical Microsensor Systems in CMOS Technology” *Microtechnology and MEMS series*, Springer 2005
- (10) Προδρομίδης Μ. (2010). Ηλεκτροχημικοί αισθητήρες & βιοαισθητήρες, Διδακτικές σημειώσεις, Ιωάννινα
- (11) Clark, L.C and Lyons, I.R. 1962, *Ann New York Academy Sci.* 102: 29
- (12) *Analytical Electrochemistry: The Basic Concepts*, Online pdf (https://www.asdlib.org/onlineArticles/ecourseware/Kelly_Potentiometry/PDF-6-Chronoamp.pdf)

- (13) Tsekenis G., 2008, PhD Thesis, Cranfield University
- (14) Τριγάζη Μαριάννα, «Μέτρηση και επεξεργασία των πιέσεων του πέλματος με τη βοήθεια αισθητήρων», Πτυχιακή Εργασία, Πανεπιστήμιο Πατρών, 2017
- (15) Navpreet Kaur, Nirmal Prabhakar, Current scenario in organophosphates detection using electrochemical biosensors, ScienceDirect, 2017
- (16) X. Sun, S. Du, X. Wang, W. Zhao, Q. Li, A label-free electrochemical immunosensor for carbofuran detection based on a sol-gel entrapped antibody, Sensors 11 (2011) 9520e9531, <http://dx.doi.org/10.3390/s111009520>
- (17) Y. Cao, X. Sun, Y. Guo, W. Zhao, X. Wang, An electrochemical immunosensor based on interdigitated array microelectrode for the detection of chlorpyrifos, Bioprocess Biosyst. Eng. 38 (2015) 307e313, <http://dx.doi.org/10.1007/s00449-014-1269-3>
- (18) N. Kaur, H. Thakur, S. Pathak, N. Prabhakar, Acetylcholinesterase immobilized eggshell membrane-based optical biosensor for organophosphate detection, Int. J. Environ. Anal. Chem. 95 (12) (2015) 1134e1147, <http://dx.doi.org/10.1080/03067319.2015.1085526>
- (19) K.M. Song, S. Lee, C. Ban, Aptamers and their biological applications, Sensors (2012) 612e631, <http://dx.doi.org/10.3390/s120100612>
- (20) P. Chandra, Advances in clinical diagnosis through electrochemical aptamer sensors, J. Bioanal. Biomed. 5 (2013) 4442e4449, <http://dx.doi.org/10.4172/1948-593X.1000e119>
- (21) C. Zhang, L. Wang, Z. Tu, X. Sun, Q. He, Z. Lei, C. Xu, Y. Liu, X. Zhang, J. Yang, X. Liu, Y. Xu, Organophosphorus pesticides detection using broad-specific single-stranded DNA based fluorescence polarization aptamer assay, Biosens. Bioelectron. 55 (2014) 216e219, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2013.12.020>
- (22) S. Pang, T.P. Labuza, L. He, Development of a single aptamer-based surface enhanced Raman scattering method for rapid detection of multiple pesticides, Analyst 139 (2014) 1895e1901, <http://dx.doi.org/10.1039/c3an02263c>
- (23) L. Fan, G. Zhao, H. Shi, M. Liu, Z. Li, A highly selective electrochemical impedance spectroscopy-based aptasensor for sensitive detection of acetamiprid, Biosens. Bioelectron. 43 (2013) 12e18, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2012.11.033>
- (24) M. Wang, Z. Li, Nano-composite ZrO₂/Au film electrode for voltammetric detection of parathion, Sens. Actuator B 133 (2008) 607e612, <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2008.03.023>
- (25) J. Gong, X. Miao, H. Wan, D. Song, Facile synthesis of zirconia nanoparticles decorated graphene hybrid nanosheets for an enzymeless methyl parathion sensor, Sens. Actuator B 162 (2012) 341e347, <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2011.12.094>

- (26) Rhouati, A., Marty, J.-L., & Vasilescu, A. (2018). Metal Nanomaterial-Assisted Aptasensors for Emerging Pollutants Detection. *Nanotechnology and Biosensors*, 193–231. doi:10.1016/b978-0-12-813855-7.00007-6
- (27) H. Li, C. Xie, S. Li, K. Xu, Electropolymerized molecular imprinting on gold nanoparticles carbon nanotube modified electrode for electrochemical detection of triazophos, *Colloids Surf. B Biointerf.* 89 (2012) 175-181, <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.09.010>
- (28) X. Xue, Q. Wei, D. Wu, H. Li, Y. Zhang, R. Feng, B. Du, Determination of methyl parathion by a molecularly imprinted sensor based on nitrogen doped graphene sheets, *Electrochim. Acta* 116 (2014) 366-371, <http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2013.11.075>
- (29) Asif I. Zia, Subhas Chandra Mukhopadhyay, Pak-Lam Yu, I.H. Al-Bahadly, Chinthaka P. Gooneratne, Jürgen Kosel, Rapid and molecular selective electrochemical sensing of phthalates in aqueous solution, *ScienceDirect*, 2014, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2014.08.050>
- (30) Yu Han, Donglin Diao, Zhangwei Lu, Xiaoning Li, Qian Guo, Yumeng Huo, Qing Xu, Youshan Li, Shengli Cao, Jianchun Wang, Yuan Wang, Jiaying Zhao, Zhongfeng Li, Miao He, Zhaofeng Luo and Xinhui Lou, Selection of Group-Specific Phthalic Acid Esters Binding DNA Aptamers via Rationally Designed Target Immobilization and Applications for Ultrasensitive and Highly Selective Detection of Phthalic Acid Esters, *Anal. Chem.* 2017, 89, 5270-5277, DOI: 10.1021/acs.analchem.6b04808
- (31) Asif I. Zia, Nasrin Afsarimanesh, Li Xie, Anindya Nag, I. H. Al-Bahadly and P.L. Yu, Improved Detection Limits for Phthalates by Selective Solid-phase Micro-extraction, 2015 Ninth International Conference on Sensing Technology
- (32) Everlyne A. Songa, Jonathan O. Okonkwo, Recent approaches to improving selectivity and sensitivity of enzyme-based biosensors for organophosphorus pesticides: A review, *Talanta* 155 (2016) 289–304
- (33) Hianik, T. and Wang, J. (2009), Electrochemical Aptasensors – Recent Achievements and Perspectives. *Electroanalysis*, 21: 1223-1235. doi:10.1002/elan.200904566
- (34) Bănică, F.-G. (2012). *Chemical Sensors and Biosensors: Fundamentals and Applications*. Chemical Sensors and Biosensors: Fundamentals and Applications. Doi: 10.1002/9781118354162
- (35) Βασικές Αρχές Ηλεκτροχημείας, Ιοντικά Διαλύματα και Ηλεκτροχημική Κινητική, Αντώνης Καραντώνης, 17 Μαΐου 2010
- (36) Κοκκινίδης Γ.Ι. (1992). Αρχές και μέθοδοι μελέτης ηλεκτροδιακών δράσεων. Εκδόσεις Γιαχούδη-Γιαπούλη, Θεσσαλονίκη

- (37) H. Van Parys, IRDE and RDE electrochemical cells evaluation: comparison of electron and mass transfer, Simulation of Electrochemical Processes II, WIT Transactions on Engineering Sciences, Vol 54, © 2007 WIT Press
- (38) Basics of Electrochemical Impedance Spectroscopy, Gamry instruments, Application Note
- (39) J. Susan Van Dyk, Brett Pletschke, Review on the use of enzymes for the detection of organochlorine, organophosphate and carbamate pesticides in the environment, Chemosphere 82 (2011) 291–307
- (40) Miroslav Pohanka, 2015, Biosensors containing acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as recognition tools for detection of various compounds, Chemical Papers DOI: 10.2478/s11696-014-0542-x
- (41) http://proteopedia.org/wiki/index.php/Human_Acetylcholinesterase
- (42) <http://depts.washington.edu/opchild/acute.html>
- (43) Šárka Štěpánková & Katarína Vorčáková (2016) Cholinesterase-based biosensors, Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 31:sup3, 180-193, DOI:10.1080/14756366.2016.1204609
- (44) Wei, M.; Wang, J. A novel acetylcholinesterase biosensor based on ionic liquids-AuNPs-porous carbon composite matrix for detection of organophosphate pesticides. Sens. Actuators B Chem. (2015), 211, 290–296
- (45) Everlyne A. Songa, Jonathan O. Okonkwo, Recent approaches to improving selectivity and sensitivity of enzyme-based biosensors for organophosphorus pesticides: A review, Talanta 155 (2016) 289–304
- (46) Liu, T.; Su, H.; Qu, X.; Ju, P.; Cui, L.; Ai, S. Acetylcholinesterase biosensor based on 3-carboxyphenylboronic acid/reduced graphene oxide-gold nanocomposites modified electrode for amperometric detection of organophosphorus and carbamate pesticides. Sens. Actuators B Chem. 2011, 160, 1255–1261
- (47) Mohamed E. I. Badawy and Ahmed F. El-Aswad, Bioactive Paper Sensor Based on the Acetylcholinesterase for the Rapid Detection of Organophosphate and Carbamate Pesticides, International Journal of Analytical Chemistry, 2014, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/536823>
- (48) Audrey Sassolas, Beatriz Prieto-Simón, Jean-Louis Marty, Biosensors for Pesticide Detection: New Trends, American Journal of Analytical Chemistry, 2012, 3, 210-232
- (49) R.K. Mishra, R.B. Dominguez, S. Bhand, R. Muñoz, J.L. Marty, A novel automated flow-based biosensor for the determination of organophosphate pesticides in milk, Biosens. Bioelectron. 32 (2012) 56–61

- (50) E. Gorecka, M. Jastrzebska, Review article: immobilization techniques and biopolymer carriers, *Biotechnol. Food Sci.* 75 (2011) 65e86
- (51) A. Ambrosi, C.K. Chua, A. Bonanni, M. Pumera, Electrochemistry of graphene and related materials, *Chem. Rev.* 114 (2014) 7150e7188, <http://dx.doi.org/10.1021/cr500023c>
- (52) Zhou, Q., Yang, L., Wang, G., & Yang, Y. (2013). Acetylcholinesterase biosensor based on SnO₂ nanoparticles–carboxylic graphene–nafion modified electrode for detection of pesticides. *Biosensors and Bioelectronics*, 49, 25–31. DOI:10.1016/j.bios.2013.04.037.
- (53) http://www.dropsens.com/en/fags_dropsens.html
- (54) Andreescu S., Nogue T., Magearu V., Marty J.-L., Screen-printed electrode based on AChE for the detection of pesticides in presence of organic solvents. Elsevier Science B.V, *Talanta* 57 (2002) 169–176.
- (55) Mionetto N., Marty J.-L., Karube I., Acetylcholinesterase in organic solvents for the detection of pesticides: Biosensor application, *Biosensors & Bioelectronics* 9 (1994) 463-470
- (56) Fabiana Arduini and Aziz Amine, *Biosensors Based on Enzyme Inhibition*, *Biochem Eng Biotechnol* (2014) 140: 299–326
- (57) Lee M. Fischer et al., Gold cleaning methods for electrochemical detection applications, *Microelectronic Engineering* 86 (2009) 1282–1285
- (58) Anzai, J. (2015). Biosensors for the Detection of OP Nerve Agents. *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents*, 925–934. doi:10.1016/b978-0-12-800159-2.00062-2
- (59) Ju, H., & Kandimalla, V. B. (2008). Biosensors for pesticides. *Electrochemical Sensors, Biosensors and Their Biomedical Applications*, 31–56. doi:10.1016/b978-012373738-0.50004-0
- (60) Raileanu, A., Piazzoni, C., Borghi, F., Bettini, L. G., Shacham-Diamand, Y., Santaniello, T., & Milani, P. (2018). An Amperometric Sensor for Thiocholine Based on Cluster-Assembled Zirconia Modified Electrodes. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 18(10), 6905–6912. doi:10.1166/jnn.2018.15518
- (61) Love; et al. (2005). "Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology". *Chem. Rev.* 105 (4): 1103–1170.
- (62) Schwartz, D.K., Mechanisms and Kinetics of Self-Assembled Monolayer Formation (2001). "Mechanisms and kinetics of self-assembled monolayer formation". *Annu. Rev. Phys. Chem.* 52: 107–37.
- (63) Alice H. Suroviec, Effect of SAM Chain Length on Mediated Amperometric Detection of Glucose, *ECS Transactions*, 64 (34) 13-20 (2015), Doi: 10.1149/06434.0013ecst ©The Electrochemical Society

- (64) Coelho, D., & Machado, S. A. S. (2014). New contribution in the study of phase formation in mixed alkanethiol self-assembled monolayers: a powerful tool for transducers design. *Electrochimica Acta*, 142, 191–201. doi:10.1016/j.electacta.2014.07.112
- (65) Achalkumar et al., “Cholesterol-based anchors and tethers for phospholipid bilayers and for model biological membranes”, *Soft Matter*, 2010
- (66) https://shodhganga.inflibnet.ac.in/bitstream/10603/134897/12/13_chapter4.pdf
- (67) Chira A. et al., “A comparative study of gold electrodes modification methods with aromatic compounds based on diazonium and thiol chemistry”, *U.P.B. Sci. Bull., Series B*, Vol. 74, Iss. 1, 2012
- (68) Arduini F. et al., “Detection of carbamic and organophosphorous pesticides in water samples using a cholinesterase biosensor based on Prussian Blue-modified screen-printed electrode, *Analytica Chimica Acta* 580 (2006) 155–162
- (69) Mohamad, N. R., Marzuki, N. H. C., Buang, N. A., Huyop, F., & Wahab, R. A. (2015). An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 29(2), 205–220, doi:10.1080/13102818.2015.1008192
- (70) Tharini Jeyapragasam, Ramiah Saraswathi,” Electrochemical biosensing of carbofuran based on acetylcholinesterase immobilized onto iron oxide–chitosan nanocomposite”, *Sensors and Actuators B* 191 (2014) 681– 687
- (71) Wang, H. (2016). A Sensitive Acetylcholinesterase Biosensor Based on Screen Printed Electrode Modified with Fe₃O₄ Nanoparticle and Graphene for Chlorpyrifos Determination. *International Journal of Electrochemical Science*, 10906–10918. doi:10.20964/2016.12.90
- (72) Jeyapragasam, T., & Saraswathi, R. (2014). Electrochemical biosensing of carbofuran based on acetylcholinesterase immobilized onto iron oxide–chitosan nanocomposite. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 191, 681–687. doi:10.1016/j.snb.2013.10.054
- (73) Arduini, F., Di Nardo, F., Amine, A., Micheli, L., Palleschi, G., & Moscone, D. (2012). Carbon Black-Modified Screen-Printed Electrodes as Electroanalytical Tools. *Electroanalysis*, 24(4), 743–751. doi:10.1002/elan.201100561
- (74) Talarico, D., Arduini, F., Amine, A., Cacciotti, I., Moscone, D., & Palleschi, G. (2016). Screen-printed electrode modified with carbon black and chitosan: a novel platform for acetylcholinesterase biosensor development. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408(26), 7299–7309. doi:10.1007/s00216-016-9604-y

- (75) Deroco, P. B., Fatibello-Filho, O., Arduini, F., & Moscone, D. (2019). Effect of Different Carbon Blacks on the Simultaneous Electroanalysis of Drugs as Water Contaminants Based on Screen-printed Sensors. *Electroanalysis*.doi:10.1002/elan.201900042
- (76) Silva, T. A., Moraes, F. C., Janegitz, B. C., & Fatibello-Filho, O. (2017). Electrochemical Biosensors Based on Nanostructured Carbon Black: A Review. *Journal of Nanomaterials*, 2017, 1–14.doi:10.1155/2017/4571614
- (77) Sriwichai, S., Baba, A., Phanichphant, S., Kazunari Shinbo, Keizo Kato, & Futao Kaneko. (2008). Electropolymerized poly(3-aminobenzoic acid)-based surface plasmon resonance immunosensor. 2008 International Symposium on Electrical Insulating Materials (ISEIM 2008).doi:10.1109/iseim.2008.4664451
- (78) Ricci, F., Gonçalves, C., Amine, A., Gorton, L., Palleschi, G., & Moscone, D. (2003). Electroanalytical Study of Prussian Blue Modified Glassy Carbon Paste Electrodes. *Electroanalysis*, 15(14), 1204–1211.doi:10.1002/elan.200390148
- (79) Sun, X., & Wang, X. (2010). Acetylcholinesterase biosensor based on prussian blue-modified electrode for detecting organophosphorous pesticides. *Biosensors and Bioelectronics*, 25(12), 2611–2614.doi:10.1016/j.bios.2010.04.028
- (80) Yin, H., Ai, S., Xu, J., Shi, W., & Zhu, L. (2009). Amperometric biosensor based on immobilized acetylcholinesterase on gold nanoparticles and silk fibroin modified platinum electrode for detection of methyl paraoxon, carbofuran and phoxim. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 637(1-2), 21–27.doi:10.1016/j.jelechem.2009.09.025
- (81) Hart, J. P., & Hartley, I. C. (1994). Voltammetric and amperometric studies of thiocholine at a screen-printed carbon electrode chemically modified with cobalt phthalocyanine: studies towards a pesticide sensor. *The Analyst*, 119(2), 259.doi:10.1039/an9941900259
- (82) Arduini, F., Forchielli, M., Amine, A., Neagu, D., Cacciotti, I., Nanni, F., Palleschi, G. (2014). Screen-printed biosensor modified with carbon black nanoparticles for the determination of paraoxon based on the inhibition of butyrylcholinesterase. *Microchimica Acta*, 182(3-4), 643–651.doi:10.1007/s00604-014-1370-y
- (83) Hartley, I. C., & Hart, J. P. (1994). Amperometric measurement of organophosphate pesticides using a screen-printed disposable sensor and biosensor based on cobalt phthalocyanine. *Analytical Proceedings Including Analytical Communications*, 31(11), 333. doi:10.1039/ai9943100333
- (84) https://nanobioelectronics.weebly.com/uploads/3/8/8/6/38862535/review_of_tech_niques_for_electrochemical_analysis.pdf
- (85) Koopal, C. G. J., Eijssma, B., & Nolte, R. J. M. (1993). Chronoamperometric detection of glucose by a third generation biosensor constructed from conducting microtubules of polypyrrole. *Synthetic Metals*, 57(1), 3689–3695. doi:10.1016/0379-6779(93)90498-l

- (86) Rhouati, A., Catanante, G., Nunes, G., Hayat, A., & Marty, J.-L. (2016). Label-Free Aptasensors for the Detection of Mycotoxins. *Sensors*, 16(12), 2178. doi:10.3390/s16122178
- (87) Li, B.; Dong, S.; Wang, E. Homogeneous analysis: Label-free and substrate-free aptasensors. *Chem.—An Asian J.* 2010, 5, 1262–1272.
- (88) Elshafey, R., Siaj, M., & Zourob, M. (2015). DNA aptamers selection and characterization for development of label-free impedimetric aptasensor for neurotoxin anatoxin-a. *Biosensors and Bioelectronics*, 68, 295–302. doi:10.1016/j.bios.2015.01.002
- (89) Ferapontova, E. E., Olsen, E. M., & Gothelf, K. V. (2008). An RNA Aptamer-Based Electrochemical Biosensor for Detection of Theophylline in Serum. *Journal of the American Chemical Society*, 130(13), 4256–4258. doi:10.1021/ja711326b
- (90) Dongfei Chen, Yancui Jiao, Huiying Jia, Yemin Guo, Xia Sun, Xiangyou Wang, Jianguang Xu, Acetylcholinesterase Biosensor for Chlorpyrifos Detection Based on Multi-Walled Carbon Nanotubes-SnO₂-chitosan Nanocomposite Modified Screen-Printed Electrode, *Int. J. Electrochem. Sci.*, Vol. 10, 2015
- (91) Wang, H. (2016). A Sensitive Acetylcholinesterase Biosensor Based on Screen Printed Electrode Modified with Fe₃O₄ Nanoparticle and Graphene for Chlorpyrifos Determination. *International Journal of Electrochemical Science*, 10906–10918. doi:10.20964/2016.12.90
- (92) Rathod, A. L., & Garg, R. K. (2017). Chlorpyrifos poisoning and its implications in human fatal cases: A forensic perspective with reference to Indian scenario. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 47, 29–34. doi:10.1016/j.jflm.2017.02.003
- (93) Viswanathan, S., Radecka, H., & Radecki, J. (2009). Electrochemical biosensor for pesticides based on acetylcholinesterase immobilized on polyaniline deposited on vertically assembled carbon nanotubes wrapped with ssDNA. *Biosensors and Bioelectronics*, 24(9), 2772–2777. doi:10.1016/j.bios.2009.01.044
- (94) El-Moghazy, A. Y., Soliman, E. A., Ibrahim, H. Z., Noguier, T., Marty, J.-L., & Istamboulie, G. (2016). Ultra-sensitive biosensor based on genetically engineered acetylcholinesterase immobilized in poly (vinyl alcohol)/Fe–Ni alloy nanocomposite for phosmet detection in olive oil. *Food Chemistry*, 203, 73–78. doi:10.1016/j.foodchem.2016.02.014
- (95) Sun, L., Jin, H., Zhao, X., Liu, Z., Guan, Y., Yang, Z., ... Zhang, L. (2014). Unfolding and Conformational Variations of Thrombin-Binding DNA Aptamers: Synthesis, Circular Dichroism and Molecular Dynamics Simulations. *ChemMedChem*, 9(5), 993–1001. doi:10.1002/cmdc.201300564
- (96) Lu, Y., Zhu, N., Yu, P., & Mao, L. (2008). Aptamer-based electrochemical sensors that are not based on the target binding-induced conformational change of aptamers. *The Analyst*, 133(9), 1256. doi:10.1039/b807913g

- (97) Pathak, P. K., Kumar, A., & Prasad, B. B. (2018). Functionalized nitrogen doped graphene quantum dots and bimetallic Au/Ag core-shell decorated imprinted polymer for electrochemical sensing of anticancerous hydroxyurea. *Biosensors and Bioelectronics*. doi:10.1016/j.bios.2018.11.055
- (98) Ameer, Z. O., & Husein, M. M. (2013). *Electrochemical Behavior of Potassium Ferricyanide in Aqueous and (w/o) Microemulsion Systems in the Presence of Dispersed Nickel Nanoparticles. Separation Science and Technology, 48(5), 681–689.* doi:10.1080/01496395.2012.712594
- (99) Konopka, S. J., & McDuffie, B. (1970). Diffusion coefficients of ferri- and ferrocyanide ions in aqueous media, using twin-electrode thin-layer electrochemistry. *Analytical Chemistry, 42(14), 1741–1746.* doi:10.1021/ac50160a042

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΠΙΝΑΚΑΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Χημικός τύπος του Phosmet.....	12
Εικόνα 2: Χημικός τύπος του Chlorpyrifos	13
Εικόνα 3: Χημικός τύπος του Carbofuran	13
Εικόνα 4: Χημικός τύπος του DEHP	15
Εικόνα 5: Χημικός τύπος του DINP	15
Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση ενός βιοαισθητήρα(58).....	17
Εικόνα 7: Ιστορική εξέλιξη των βιοαισθητήρων(10).....	18
Εικόνα 8: Αμπερομετρική ανίχνευση του υπεροξειδίου του υδρογόνου.....	19
Εικόνα 9: Κατηγορίες βιοαισθητήρων (14)	29
Εικόνα 10: Βιομόρια που χρησιμοποιούνται στους αισθητήρες(14).....	30
Εικόνα 11: Χημική αντίδραση που λαμβάνει χώρα σε ποτενσιομετρικό μικροβιακό αισθητήρα.(14).....	31
Εικόνα 12: Χημικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα σε αμπερομετρικό βιοαισθητήρα (14).....	31
Εικόνα 13: Σχηματική επικόνιση ηλεκτροχημικού μικροβιακού αισθητήρα(14)	32
Εικόνα 14: DNA-βιοαισθητήρας(14).....	33
Εικόνα 15: Λειτουργία βιοαισθητήρα βασισμένου σε αντισώματα(16).....	35
Εικόνα 16: Απεικόνιση του μηχανισμού κατασκευής και ανίχνευσης των OPs με τη βοήθεια απταμερών.....	36
Εικόνα 17: Μηχανισμός ανίχνευσης των OPs χρησιμοποιώντας NP αισθητήρες.....	38

Εικόνα 18: Απεικόνιση των βημάτων κατασκευής ηλεκτροχημικού βιοαισθητήρα με την χρήση νανοσωματιδίων.....	38
Εικόνα 19: Διαφορετικές φάσεις που εμπλέκονται στη διαδικασία μοριακής εκτύπωσης και ο μηχανισμός λειτουργίας ενός MIP.....	40
Εικόνα 20: Διαδικασία σύνθεσης των MIPs (30).....	43
Εικόνα 21: Η χημική αντίδραση που καταλύει η AChE.....	45
Εικόνα 22: Σχηματική απεικόνιση της δράσης της AChE χωρίς την παρουσία οργανοφωσφορικών(41).....	46
Εικόνα 23: Δράση της AChE απουσία και παρουσία των οργανοφωσφορικών ενώσεων(15).....	46
Εικόνα 24: Δράση της AChE στις νευρικές συνάψεις (42).....	47
Εικόνα 25: α) Τυπική απόκριση πριν και μετά την αναστολή στην περίπτωση που ο βιοαισθητήρας βασίζεται σε αναστρέψιμη αναστολή και β) σε περίπτωση της μη αναστρέψιμης αναστολής (56).....	48
Εικόνα 26: Αντίδραση που καταλύεται από τη BuChE.....	49
Εικόνα 27: Δράση της ALP.....	50
Εικόνα 28: Δράση οξικής φωσφατάσης.....	51
Εικόνα 29: Τρόποι ακινητοποίησης ενζύμων στην επιφάνεια βιοαισθητήρων(42).....	54
Εικόνα 30: Αντίδραση Ellman και έλεγχος της δράσης του ενζύμου.....	57
Εικόνα 31: Σχηματική παράσταση εξασθένησης της έντασης του φωτός καθώς διαπερνά την κυψελίδα.....	59
Εικόνα 32: Κατανομή των ενζύμων που χρησιμοποιούνται για την κατασκευή βιοαισθητήρων βασισμένων σε ενζυμική αναστολή (περίοδος 2006-2012) (56).....	59
Εικόνα 33: α) Αναστολή ενζύμου στην περίπτωση μη αναστρέψιμης μορφής, b) αναστρέψιμης αναστολής ανταγωνιστικής μορφής, c) μη ανταγωνιστικής μορφής, d) uncompetitive και e) συνδυασμός μορφών αναστολής (56).....	60
Εικόνα 34: (A) ηλεκτροχημικές αντιδράσεις (B) δράση της AChE(44).....	61
Εικόνα 35: Αναπαράσταση της δομής μιας αυτοσυναρμολογούμενης μονοστιβαδας (SAM).....	68
Εικόνα 36: Δομή και χημική προσρόφηση του μερκαπτο-ενδεκανοϊκού οξέως (11-MUA) στην επιφάνεια χρυσού (66).....	69
Εικόνα 37: Μίξη μερκαπτο-ενδεκανοϊκού οξέος με μερκαπτο-εξανόλη πάνω στην επιφάνεια χρυσού (65).....	69

Εικόνα 38: Διάταξη Διαζωνικών αλάτων πάνω σε επιφάνεια χρυσού (67).....	70
Εικόνα 39: Βήματα για την κατασκευή ηλεκτροχημικού βιοαισθητήρα(15).....	71
Εικόνα 40: Ακίνητοποίηση της AChE σε διάφορους τύπους ηλεκτροδίων	74
Εικόνα 41: Σχηματική απεικόνιση της μορφολογίας του Carbon Black στη νανοκλίμακα (76).....	75
Εικόνα 42: Σηματοδότηση του αναλύτη (A), του απταμερούς (B, D, E) ή ενός συμπληρωματικού κλώνου προς το απταμερές (C) μ' ένα ηλεκτροενεργό μόριο για την πραγματοποίηση αμπερομετρικών μετρήσεων.....	76
Εικόνα 43 : (α) Ανταλλαγή φορτίου σε μεταλλικό ηλεκτρόδιο M εμβαπτισμένο σε διάλυμα άλατος του, MA, (β) φυσική προσρόφηση πολικών ουδέτερων μορίων και (γ) χημική προσρόφηση ιόντων. (35)	80
Εικόνα 44: Τριγωνικό δυναμικό που εφαρμόζεται στην κυκλική βολταμετρία(13)	83
Εικόνα 45 : Τυπικό κυκλικό βολταμογράφημα	83
Εικόνα 46 : Διάγραμμα Nyquist.....	86
Εικόνα 47 : Ισοδύναμο ηλεκτρικό κύκλωμα Randles.....	87
Εικόνα 48 : Διάγραμμα Bode.....	88
Εικόνα 49 : Ισοδύναμο κύκλωμα Randles που περιλαμβάνει το στοιχείο Warburg και το διάγραμμα εμπέδησης του.....	88
Εικόνα 50: Δυναμικό και ρεύμα κατά τη διάρκεια του παλμού στην παλμική βολταμετρία(36).....	90
Εικόνα 51: Αριστερά το διάγραμμα εφαρμοζόμενου δυναμικού συναρτήσεως του χρόνου. Δεξιά το διάγραμμα συγκέντρωσης του οξειδωαναγωγικού ζεύγους συναρτήσεως της απόστασης από την επιφάνεια του ηλεκτροδίου(12).....	91
Εικόνα 52: Το ηλεκτρόδιο χρυσού DRP-C220 BT.....	102
Εικόνα 53: Αριστερά το ηλεκτρόδιο άνθρακα DRP-110, δεξιά το ηλεκτρόδιο άνθρακα DRP-C11L.....	102
Εικόνα 54: Φθορά ηλεκτροδίου χρυσού με τη χρήση 11-MUA σε αιθανόλη	124
Εικόνα 55: Ηλεκτρόδιο άνθρακα τροποποιημένο με Cobalt Phthalocyanine.....	136
Εικόνα 56: Σχηματική αναπαράσταση ενός ηλεκτροχημικού αισθητήρα που βασίζεται σε απταμερές, για την ανίχνευση της θεοφιλίνης με τη χρήση του Ferrocene ως οξειδωαναγωγική ετικέτα του απταμερούς (89)	188
Εικόνα 57: Σχηματική απεικόνιση της μετατόπισης του συμπληρωματικού κλώνου λόγω της πρόσδεσης του αναλύτη με το απταμερές (96).....	188

Εικόνα 58: Σχηματική απεικόνιση της αρχής διευκόλυνσης της μεταφοράς φορτίου που προκαλείται από την πρόσδεση του απταμερούς με τον αναλύτη (88)	189
Εικόνα 59: Σχηματική απεικόνιση της φυσικής προσρόφησης των απταμερών πάνω στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου χρυσού.	190
Εικόνα 60: Στάδια ακινητοποίησης απταμερών σε επιφάνεια χρυσού με σχηματισμό ομοιοπολικών δεσμών Α) χάρη στο TCEP και Β) με ηλεκτροπολυμερισμό.....	194
Εικόνα 61: Σχηματική απεικόνιση της αρχής της παρεμπόδισης μεταφοράς φορτίου που προκαλείται από την πρόσδεση του απταμερούς με τον αναλύτη (86)	196
Εικόνα 62: Δομή του απταμερούς που προσδενεται με το DEHP	199

ΠΙΝΑΚΑΣ ΕΞΙΣΩΣΕΩΝ

Εξίσωση 1: Νόμος Beer Lambert, σχέση συγκέντρωσης και απορρόφησης μιας ουσίας	58
Εξίσωση 2: Υπολογισμός αναστολής ενζύμου	62
Εξίσωση 3 : Εξίσωση Nernst	84
Εξίσωση 4 : Οξειδοαναγωγικό ζεύγος	84
Εξίσωση 5 : Νόμος του Ohm	84
Εξίσωση 6: Μιγαδική εξίσωση δυναμικού και ρεύματος.....	86
Εξίσωση 7 : Εμπέδηση.....	86
Εξίσωση 8: Εξίσωση Cottrell.....	92
Εξίσωση 9: Εξίσωσης Randles-Sevcik για τον υπολογισμό της ενεργούς επιφάνειας A_{eff}	139

ΠΙΝΑΚΑΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

Γράφημα 1: Μέτρηση απορρόφησης συναρτήσει του χρόνου για 7.5, 15, 30 και 60 Units/ mL ενζύμου και 1 mM υποστρώματος, στα 412 nm	97
Γράφημα 2: Μέτρηση απορρόφησης συναρτήσει του χρόνου για διάφορες συγκεντρώσεις υποστρώματος με 60 Units/ mL ενζύμου, στα 412 nm.....	98
Γράφημα 3: Μέτρηση απορρόφησης συναρτήσει της θερμοκρασίας	98
Γράφημα 4: Επίδραση διαφορετικών οργανικών διαλυτών στη δραστηριότητα του ενζύμου	99

Γράφημα 5: Επίδραση του Chlorpyrifos και του Phosmet στην AChE.....	100
Γράφημα 6: Επίδραση του Carbofuran στην AChE	101
Γράφημα 7: Αρχικά CVs 7 ηλεκτροδίων χρυσού χαρακτηρισμένων σε 5 mM $K_3Fe(CN)_6$ - $K_4Fe(CN)_6$ σε 1x PBS με scan rate 20 mV/s.....	103
Γράφημα 8 : Διαγράμματα EIS 7 ηλεκτροδίων χρυσού χαρακτηρισμένων σε 5 mM $K_3Fe(CN)_6$ - $K_4Fe(CN)_6$ σε 1x PBS	104
Γράφημα 9: Αρχικά CVs 2 ηλεκτροδίων άνθρακα χαρακτηρισμένων σε 5 mM $K_3Fe(CN)_6$ - $K_4Fe(CN)_6$ σε 1x PBS με scan rate 50 mV/s	105
Γράφημα 12: Αρχικά διαγράμματα εμπέδησης 2 ηλεκτροδίων άνθρακα χαρακτηρισμένων σε 5 mM $K_3Fe(CN)_6$ - $K_4Fe(CN)_6$ σε 1x PBS.....	106
Γράφημα 11: CV για πριν και μετά τον καθαρισμό ηλεκτροδίου με 0,5M NaOH, χαρακτηρισμός σε 5 mM $K_3Fe(CN)_6$ - $K_4Fe(CN)_6$ σε 1x PBS με scan rate 50 mV/s....	107
Γράφημα 12: Πριν και μετά τον καθαρισμό ηλεκτροδίου με 30mM Ferrocyanide σε PBS, χαρακτηρισμός σε 5 mM $K_3Fe(CN)_6$ - $K_4Fe(CN)_6$ σε 1x PBS με scan rate 50 mV/s....	108
Γράφημα 13: CV πριν τον καθαρισμό και μετά απο 10 και 20 κύκλους με 0,1 M H_2SO_4 , χαρακτηρισμός σε 5 mM $K_3Fe(CN)_6$ - $K_4Fe(CN)_6$ σε 1x PBS με scan rate 50 mV/s....	109
Γράφημα 14: CV 3 ηλεκτροδίων μετά τον καθαρισμό με το πρωτόκολλο της Dropsens, χαρακτηρισμός σε 5 mM $K_3Fe(CN)_6$ - $K_4Fe(CN)_6$ σε 1x PBS με scan rate 50 mV/s....	109
Γράφημα 15: CV πριν και μετά τον καθαρισμό με Alumina slurry και sonication σε διαφορετικούς χρόνους, χαρακτηρισμός σε 5 mM $K_3Fe(CN)_6$ - $K_4Fe(CN)_6$ σε 1x PBS με scan rate 50 mV/s	111
Γράφημα 16: CVs 6 ηλεκτροδίων ύστερα από καθαρισμό με H_2SO_4 , 100mV/s, 5 cycles, [1,-1.5]V, χαρακτηρισμός σε 5 mM $K_3Fe(CN)_6$ - $K_4Fe(CN)_6$ σε 1x PBS με scan rate 50 mV/s	112
Γράφημα 17: Διαγράμματα Nyquist 6 ηλεκτροδίων μετά τον καθαρισμό με H_2SO_4 , 100mV/s, 5 cycles, [1,-1.5]V και σύγκριση με πριν τον καθαρισμό, χαρακτηρισμός σε 5 mM $K_3Fe(CN)_6$ - $K_4Fe(CN)_6$ σε 1x PBS.....	113
Γράφημα 18: CV διαγράμματα 2 ηλεκτροδίων χρυσού πριν και μετά τον καθαρισμό με 0,5 M Θεικό οξύ, στα 100 mV/s, 5 cycles, χαρακτηρισμός σε 5 mM $K_3Fe(CN)_6$ - $K_4Fe(CN)_6$ σε 1x PBS με scan rate 50 mV/s	114
Γράφημα 19: PEIS διαγράμματα 2 ηλεκτροδίων χρυσού πριν και μετά τον καθαρισμό με 0,5 M Θεικό οξύ, στα 100 mV/s, 5 cycles, χαρακτηρισμός σε 5 mM $K_3Fe(CN)_6$ - $K_4Fe(CN)_6$ σε 1x PBS	114

Γράφημα 20: CVs για ηλεκτρόδιο άνθρακα πριν και μετά τον καθαρισμό με αιθανόλη, χαρακτηρισμένο σε 5 mM $K_3Fe(CN)_6 - K_4Fe(CN)_6$ σε 1x PBS, με scan rate 50 mV/s.	115
Γράφημα 21: CVs για 3 ηλεκτρόδια άνθρακα πριν και μετά τον καθαρισμό με 0,5 M Θεικό οξύ, στα 100 mV/s, 5 cycles, χαρακτηρισμένα σε 5 mM $K_3Fe(CN)_6 - K_4Fe(CN)_6$ σε 1x PBS, με scan rate 50 mV/s	116
Γράφημα 22: Διαφορά ηλεκτροδίων χρυσού μετά τον καθαρισμό και άνθρακα χωρίς καθαρισμό, χαρακτηρισμός σε 5 mM $K_3Fe(CN)_6 - K_4Fe(CN)_6$ σε 1x PBS, με scan rate 50 mV/s	117
Γράφημα 23: CV για το Phosphate Buffer 50 mM με 0,1 M KCl και 5mM θειοχολίνη με scan rate 50 mV/s σε ηλεκτρόδιο χρυσού	118
Γράφημα 24: DPV για το Phosphate Buffer 50 mM με 0,1 M KCl, τη θειοχολίνη σε Phosphate Buffer αλλά και σε απεσταγμένο νερό με συγκέντρωση 5mM	120
Γράφημα 25: CV για το Phosphate Buffer 50 mM με 0,1 M KCl και τη θειοχολίνη (5mM) με scan rate 50 mV/s σε ηλεκτρόδιο άνθρακα	121
Γράφημα 26: CVs για ατροποποίητο ηλεκτρόδιο χρυσού και τροποποιημένο με 1mM, 10 mM, 50 mM και 100 mM 11-MUA, ο χαρακτηρισμός έγινε σε 5 mM $K_3Fe(CN)_6 - K_4Fe(CN)_6$ σε 1x PBS με scan rate 50 mV/s	123
Γράφημα 27: CVs για ατροποποίητο ηλεκτρόδιο χρυσού και 2 τροποποιημένα με 1mM 11-MUA, ο χαρακτηρισμός έγινε σε 5 mM $K_3Fe(CN)_6 - K_4Fe(CN)_6$ σε 1x PBS με scan rate 50 mV/s	124
Γράφημα 28: CVs για ατροποποίητο ηλεκτρόδιο χρυσού και 2 τροποποιημένα με 1mM 11-MUA μαζί με MCH, ο χαρακτηρισμός έγινε σε 5 mM $K_3Fe(CN)_6 - K_4Fe(CN)_6$ σε 1x PBS με scan rate 50 mV/s	125
Γράφημα 29: CVs για το ατροποποίητο ηλεκτρόδιο χρυσού και για τα 4 τροποποιημένα ηλεκτρόδια του Πίνακα 6, ο χαρακτηρισμός έγινε σε 5 mM $K_3Fe(CN)_6 - K_4Fe(CN)_6$ σε 1x PBS με scan rate 50 mV/s	126
Γράφημα 30: Τροποποίηση επιφάνειας χρυσού με NPs μαγνητήτη σε διαφορετικά διαλύματα, ο χαρακτηρισμός έγινε σε Phosphate Buffer 50 mM, με scan rate 50 mV/s	128
Γράφημα 31: Τροποποίηση επιφάνειας άνθρακα με NPs μαγνητήτη σε διαφορετικά διαλύματα, ο χαρακτηρισμός έγινε σε 5 mM $K_3Fe(CN)_6 - K_4Fe(CN)_6$ σε 1x PBS, με scan rate 50 mV/s	130

Γράφημα 32: CVs για ηλεκτρόδιο άνθρακα τροποποιημένο με νανοσωματίδια μαγνητήτη σε χιτοζάνη, με Phosphate Buffer 50 mM και με 5mM θειοχολίνη, με scan rate 50 mV/s	131
Γράφημα 33: CVs για το χαρακτηρισμό ενός ατροποποίητου ηλεκτροδίου άνθρακα και ενός τροποποιημένου με χημική σύνθεση Prussian Blue, χαρακτηρισμός σε 50 mM Phosphate Buffer pH 7,4+ 0,1 M KCl με 5mM $K_3Fe(CN)_6 - K_4Fe(CN)_6$, με scan rate 50 mV/s	132
Γράφημα 34: CVs για ηλεκτρόδιο άνθρακα τροποποιημένο με Prussian Blue, με Phosphate Buffer 50 mM, και με 5mM θειοχολίνη, με scan rate 50 mV/s	133
Γράφημα 35: Επαναληπτικά CVs για ηλεκτρόδιο άνθρακα τροποποιημένο με Prussian Blue, με Phosphate Buffer 50 mM και με θειοχολίνη, με scan rate 50 mV/s	134
Γράφημα 36: CVs για ηλεκτρόδιο DRP-710, με Phosphate Buffer 50 mM και με θειοχολίνη, με scan rate 50 mV/s	135
Γράφημα 37: CVs για ηλεκτρόδιο DRP-410, με Phosphate Buffer 50 mM και με 10 και 20mM θειοχολίνη, με scan rate 50 mV/s	137
Γράφημα 38: CVs για το χαρακτηρισμό ενός ηλεκτροδίου DRP-110, ενός τροποποιημένου με Carbon Black σε DMF/H ₂ O και ενός τροποποιημένου με Carbon Black σε χιτοζάνη. Ο χαρακτηρισμός εγινε σε 5 mM $K_3Fe(CN)_6 - K_4Fe(CN)_6$ σε Phosphate Buffer με 0,1M KCl, με scan rate 50 mV/s	139
Γράφημα 39: CVs για 4 ηλεκτρόδια άνθρακα τροποποιημένα με Carbon Black σε χιτοζάνη, χαρακτηρισμένα με 50 mM Phosphate Buffer, με scan rate 50 mV/s	140
Γράφημα 40: CVs για ηλεκτρόδιο άνθρακα τροποποιημένο με Carbon Black σε χιτοζάνη, με Phosphate Buffer 50 mM + 0,1M KCl και με 10 και 20 mM θειοχολίνη, με scan rate 50 mV/s	141
Γράφημα 41: CVs για ηλεκτρόδια άνθρακα τροποποιημένα με Prussian Blue και Co-Pthalocyanine από τη Dropsens και με χημική σύνθεση Carbon Black σε χιτοζάνη. Ανίχνευση 10 mM θειοχολίνης με scan rate 50 mV/s	142
Γράφημα 42: CV για το DRP-410 με 100 U/mL AChE και 10mM Substrate για 10,20 και 40 λεπτά, scan rate 50 mV/s	145
Γράφημα 43: CV για το DRP-710 με 100 U/mL AChE και 10mM Substrate για 10,20 και 40 λεπτά, scan rate 50 mV/s	145
Γράφημα 44: CV για το τροποποιημένο με CB/CS ηλεκτρόδιο άνθρακα με 100 U/mL AChE και 10mM Substrate για 10,20 και 40 λεπτά, scan rate 50 mV/s	146

Γράφημα 45: CV για τα τροποποιημένα ηλεκτρόδια άνθρακα DRP-410, DRP-710 και CB/CS με 100 U/mL AChE και 10mM Substrate για 10', scan rate 50 mV/s	147
Γράφημα 46: CV για το ηλεκτρόδιο άνθρακα DRP-410 με 33 U/mL AChE, πριν και μετά το ξέπλυμα με Phosphate Buffer και μέτρηση με 10 mM υποστρώματος στα 10', με scan rate 50 mV/s	148
Γράφημα 47: CV για το ηλεκτρόδιο άνθρακα DRP-710 με 33 U/mL AChE, πριν και μετά το ξέπλυμα με Phosphate Buffer και μέτρηση με 10 mM υποστρώματος στα 10', με scan rate 50 mV/s	148
Γράφημα 48: CV για το τροποποιημένο ηλεκτρόδιο άνθρακα με CB σε χιτοζάνη, με 33 U/mL AChE, πριν και μετά το ξέπλυμα με Phosphate Buffer και μέτρηση με 10 mM υποστρώματος στα 10', με scan rate 50 mV/s	149
Γράφημα 49: CVs για το χαρακτηρισμό ενός ηλεκτροδίου DRP-110, ενός τροποποιημένου με 1 σταγόνα 2μL Carbon Black σε χιτοζάνη και ενός τροποποιημένου με 2 σταγόνες 2μL Carbon Black σε χιτοζάνη. Ο χαρακτηρισμός έγινε σε 5 mM $K_3Fe(CN)_6 - K_4Fe(CN)_6$ σε 1xPBS με 0,1M KCl, scan rate 50 mV/s	151
Γράφημα 50: CVs για το χαρακτηρισμό ηλεκτροδίων με 1,2,3 και 4 σταγόνες των 2μL Carbon Black σε χιτοζάνη και δύο ηλεκτροδίων με 2 και 3 σταγόνες των 3μL Carbon Black σε χιτοζάνη. Ο χαρακτηρισμός έγινε σε 50 mM Phosphate Buffer με 0,1M KCl, scan rate 50 mV/s	152
Γράφημα 51: CVs για το χαρακτηρισμό 4 ηλεκτροδίων τροποποιημένων με 2 σταγόνες 2μL Carbon Black σε χιτοζάνη. Ο χαρακτηρισμός έγινε σε 50 mM Phosphate Buffer με 0,1M KCl, scan rate 50 mV/s	153
Γράφημα 52: CVs για το χαρακτηρισμό 2 ηλεκτροδίων τροποποιημένων με 3 σταγόνες 2μL Carbon Black σε χιτοζάνη. Ο χαρακτηρισμός έγινε σε 50 mM Phosphate Buffer με 0,1M KCl, scan rate 50 mV/s	154
Γράφημα 53: CVs για 2 ηλεκτρόδια τροποποιημένα με 3 σταγόνες 3μL Carbon Black σε χιτοζάνη. Για 50 mM Phosphate Buffer με 0,1M KCl και για 5mM θειοχολίνη, scan rate 50 mV/s	154
Γράφημα 54: CVs για 1 ηλεκτρόδιο τροποποιημένο με 2 σταγόνες 3μL Carbon Black σε χιτοζάνη. Για 50 mM Phosphate Buffer με 0,1M KCl και για 5mM θειοχολίνη, scan rate 50 mV/s	156

Γράφημα 55: Διάγραμμα αμπερομετρίας για την απόκριση του αισθητήρα στην εισαγωγή Phosphate Buffer και στην εισαγωγή Phosphate Buffer με 5mM $K_3Fe(CN)_6 - K_4Fe(CN)_6$	158
Γράφημα 56: Αμπερομετρική απόκριση επιφάνειας άνθρακα στην εισαγωγή διαφορετικού όγκου σταγόνων 10 mMθειοχολίνης.....	160
Γράφημα 57: Σύγκριση τριών συνθηκών του διαλυματος Carbon Black, χαρακτηρισμός σε 50 mM Phosphate Buffer pH 7,4, με scan rate 50 mV/s.....	162
Γράφημα 58: Χαρακτηρισμός της επιφάνειας 2 τροποποιημένων ηλεκτροδίων άνθρακα με Carbon Black με 50 mM Phosphate Buffer pH 7,4 τη μέρα της παρασκευής τους και την επόμενη.	163
Γράφημα 59: CVs για τροποποιημένο ηλεκτρόδιο άνθρακα με CB σε χιτοζάνη ανά 1 μέρα, με 50 mM Phosphate Buffer pH 7,4, χαρακτηριζόμενο κάθε μέρα με scan rate 50 mV/s	164
Γράφημα 60: CVs για τροποποιημένο ηλεκτρόδιο άνθρακα με CB σε χιτοζάνη ανά 1 μέρα, με 50 mM Phosphate Buffer pH 7,4, με scan rate 50 mV/s.....	165
Γράφημα 61: Πάνω: 5 διαδοχικοί χαρακτηρισμοί του τροποποιημένου ηλεκτροδίου με αμπερομετρία στα 0,35 V με 50 mM Phosphate Buffer pH 7,4, Κάτω: μεγέθυνση του πάνω γραφήματος στα 10 sec	166
Γράφημα 62: Μεγέθυνση 5 διαδοχικών CVs για ένα τροποποιημένο ηλεκτρόδιο άνθρακα με CB σε χιτοζάνη, χαρακτηρισμός σε 50 mM Phosphate Buffer pH 7,4, με scan rate 50 mV/s	167
Γράφημα 63: CA για το πρώτο ηλεκτρόδιο με CB/CS και μίγμα ενζύμου (33 U/mL). Επαναλαμβανόμενη προσθήκη 50 mM Phosphate Buffer pH 7,4 και 5 mM υποστρώματος, στα 0,35V	168
Γράφημα 64: CA γράφημα του δεύτερου ηλεκτροδίου με CB/CS και μίγμα ενζύμου (33 U/mL). Χαρακτηρισμός με 50 mM Phosphate Buffer pH 7,4 για 200 sec μέχρι την σταθεροποίηση, στα 0,35V	169
Γράφημα 65: CA γραφήματα του δεύτερου ηλεκτροδίου με CB/CS και μίγμα ενζύμου (33 U/mL). Επαναλαμβανόμενη προσθήκη 5 mM υποστρώματος και 50 mM Phosphate Buffer pH 7,4, στα 0,35V	170
Γράφημα 66: CVs για το ηλεκτρόδιο 1 με ακινητοποιημένο ένζυμο (16 U/mL) πάνω στην επιφάνεια CB/CS ,με Phosphate Buffer 50 mM + 0,1 M KCl και με 10 mM ακετυλοθειοχολίνη μετά από 15,35,60 και 75', με scan rate 50 mV/s	172

Γράφημα 67: CVs για το ηλεκτρόδιο 2 με ενσωματωμένο ένζυμο (16 U/mL) μέσα στο μίγμα CB/CS , με 10 mM ακετυλοθειοχολίνη μετά από 15,35,60 και 75', με scan rate 50 mV/s	172
Γράφημα 68: CVs για ηλεκτρόδιο άνθρακα με ακινητοποιημένο ένζυμο (16 U/mL),με Phosphate Buffer 50 mM με 0,1 M KCl και με 1 mM ακετυλοθειοχολίνη μετά από 10', με scan rate 50 mV/s	173
Γράφημα 69: CVs 2 τροποποιημένων με CB/CS ηλεκτροδίων άνθρακα, με Phosphate Buffer με 10 και 20 mM KI και με 10 και 20 mM θειοχολίνης, με scan rate 50 mV/s ..	175
Γράφημα 70: CVs τροποποιημένου με CB/CS ηλεκτροδίου άνθρακα και 33 U/mL AChE, με 50 mM Phosphate Buffer +0,1M KCl, με 10 mM υποστρώματος με ιώδιο στα 0' και 10 mM υποστρώματος με χλώριο στα 0 και 10', με scan rate 50 mV/s	177
Γράφημα 71: Απόκριση για 8,16 και 33 U/mL ενζύμου με 0.1,0.25,0.5,0.75,1,2.5 και 5 mM υποστρώματος, από αμπερομετρικές μετρήσεις στα 0,25 V.....	178
Γράφημα 72: Ποσοστιαία επίδραση της συγκέντρωσης του ACN (1/1000,1/500,1/100) στη δραστηριότητα του ενζύμου.....	180
Γράφημα 73: Ποσοστιαία επίδραση της συγκέντρωσης του ACN (1/1000,1/500,1/100) στο στρώμα του CB σε χιτοζάνη και στο μίγμα του 0,1% Nafion-3% BSA.....	181
Γράφημα 74: Απόκριση του βιοαισθητήρα σε 2,5 mM υποστρώματος ιωδίου σε 1% ACN και 10^{-7} M Carbofuran (ποσοστιαία αναστολή) ως συνάρτηση της ποσότητας του ενζύμου	182
Γράφημα 75: Ποσοστιαία αναστολή του ενζύμου (16 U/mL) για διάφορες συγκεντρώσεις Carbofuran (10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} M), με 2,5 mM υποστρώματος σε 1% ACN, αμπερομετρικές μετρήσεις με 0,25V.	183
Γράφημα 76: Ποσοστιαία αναστολή του ενζύμου (16 U/mL) για διάφορες συγκεντρώσεις Chlorpyrifos (2.5,1,0.5, 0.25 και 0.1 mM), με 2,5 mM υποστρώματος σε 1% ACN, αμπερομετρικές μετρήσεις με 0,25V	185
Γράφημα 77: Ποσοστιαία αναστολή του ενζύμου (16 U/mL) για διάφορες συγκεντρώσεις Phosmet (2.5,1,0.5, 0.1 και 0.01 mM), με 2,5 mM υποστρώματος σε 1% ACN, αμπερομετρικές μετρήσεις με 0,25V	185
Γράφημα 78: Σύγκριση της εμπέδησης σε καθαρό ηλεκτρόδιο χρυσού και σε επιφάνεια με ακινητοποιημένα απταμερή (1μM) πριν και μετά το 1 μM DEHP. Ο χαρακτηρισμός έγινε σε 5 mM $K_3Fe(CN)_6$ - $K_4Fe(CN)_6$ σε Phosphate Buffer.....	190

Γράφημα 79: Εμπέδηση σε επιφάνεια χρυσού με 1 μM απταμερή μαζί με 200 μM TCEP πριν και μετά το 1 μM DEHP. Ο χαρακτηρισμός έγινε σε 5 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ - $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ σε Phosphate Buffer	192
Γράφημα 80: Εμπέδηση σε επιφάνεια χρυσού με ηλεκτροπολυμερισμένο μίγμα 1 μM απταμερούς με 200 μM TCEP, πριν και μετά το 1 μM DEHP. Ο χαρακτηρισμός έγινε σε 5 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ - $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ σε Phosphate Buffer.....	193
Γράφημα 81: Σύγκριση του ηλεκτροπολυμερισμού και της over night εναπόθεσης μίγματος 1 μM απταμερούς με 200 μM TCEP, πριν και μετά το 1 μM DEHP. Ο χαρακτηρισμός έγινε σε 5 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ - $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ σε Phosphate Buffer	193
Γράφημα 82: Εμπέδηση ηλεκτροδίου χρυσού με 1 μM απταμερές+200 μM TCEP+ 1,5 mM mPEG, πριν και μετά την προσθηκη 1 μM DEHP. Ο χαρακτηρισμός έγινε σε 5 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ - $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ σε Phosphate Buffer	195
Γράφημα 83: Καμπύλη βαθμονόμησης για 1 και 10 μM DEHP, με ακινητοποιημένο στην επιφάνεια 1 μM απταμερές+200 μM TCEP+ 1,5 mM mPEG. Ο χαρακτηρισμός έγινε σε 5 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ - $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ σε Phosphate Buffer.....	196
Γράφημα 84: Εμπέδηση ηλεκτροδίου χρυσού με 1 μM απταμερές+200 μM TCEP+ 1,5 mM mPEG, χαρακτηρισμένο πριν και μετά την προσθηκη 10 μM DEHP. Ο χαρακτηρισμός έγινε σε 5 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ - $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ σε Phosphate Buffer.....	197
Γράφημα 85: Καμπύλη βαθμονόμησης για 1 και 10 μM DEHP, με ακινητοποιημένο στην επιφάνεια 1 μM απταμερές+200 μM TCEP+ 1,5 mM mPEG. Ο χαρακτηρισμός έγινε σε 5 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ - $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ σε Phosphate Buffer.....	198
Γράφημα 86: Σύγκριση μεταξύ των σκέτων ηλεκτροδίων DRP-410 και τροποποιημένων με CB/CS, με Phosphate Buffer 50 mM + 0,1M KCl και με 10mM ενζυμικά παραγόμενη θειοχολίνη. Scan rate 50mV/s	205
Γράφημα 87: Σύγκριση μεταξύ των σκέτων ηλεκτροδίων DRP-710 και τροποποιημένων με CB/CS, με Phosphate Buffer 50 mM + 0,1M KCl και με 10mM ενζυμικά παραγόμενη θειοχολίνη. Scan rate 50mV/s	206
Γράφημα 88: Σύγκριση μεταξύ των τροποποιημένων ηλεκτροδίων DRP-410 και DRP-110 με CB/CS, με Phosphate Buffer 50 mM + 0,1M KCl και με 10mM ενζυμικά παραγόμενη θειοχολίνη. Scan rate 50mV/s	207